

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT 978-03166/sm	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/00405	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/01/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/01/1998
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSC		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

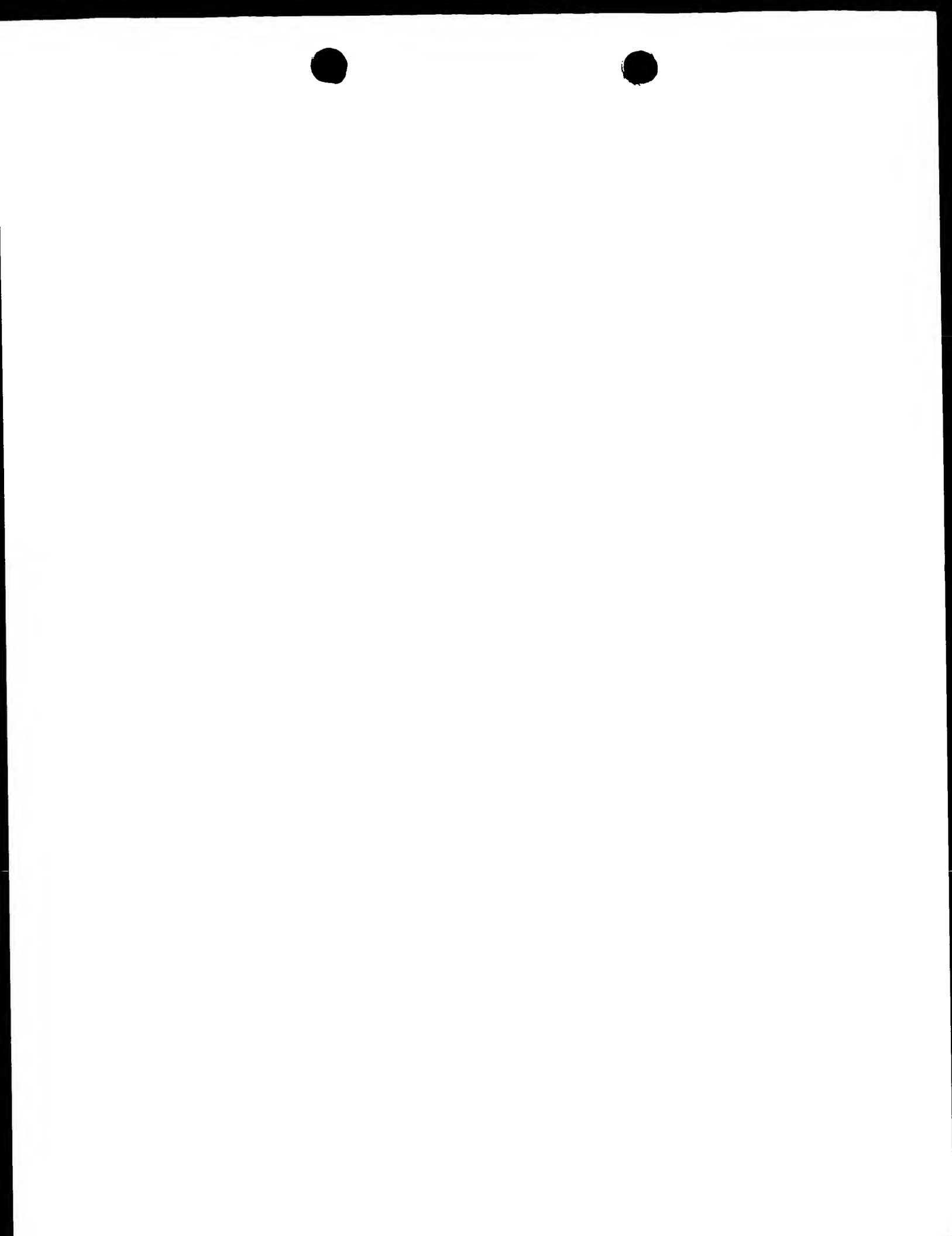
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00405

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K31/40 C07K14/71 C07K16/28 C12N15/12 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K C07K C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 13771 A (GLAXO GROUP LIMITED) 17. April 1997 siehe Seite 44 - Seite 52 ---	1-3, 29
A	MOHAMMADI M ET AL: "STRUCTURES OF THE TYROSINE KINASE DOMAIN OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR IN COMPLEX WITH INHIBITORS" SCIENCE, Bd. 276, Nr. 5314, 9. Mai 1997, Seiten 955-960, XP002065235 in der Anmeldung erwähnt ---	1-32
P, X	WO 98 24432 A (SUGEN INC.) 11. Juni 1998 siehe Seite 102 - Seite 105 --- -/-	1-3, 29, 30



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 98 50356 A (SUGEN, INC.) 12. November 1998 siehe Seite 237 - Seite 264 -----	1-3, 29, 30



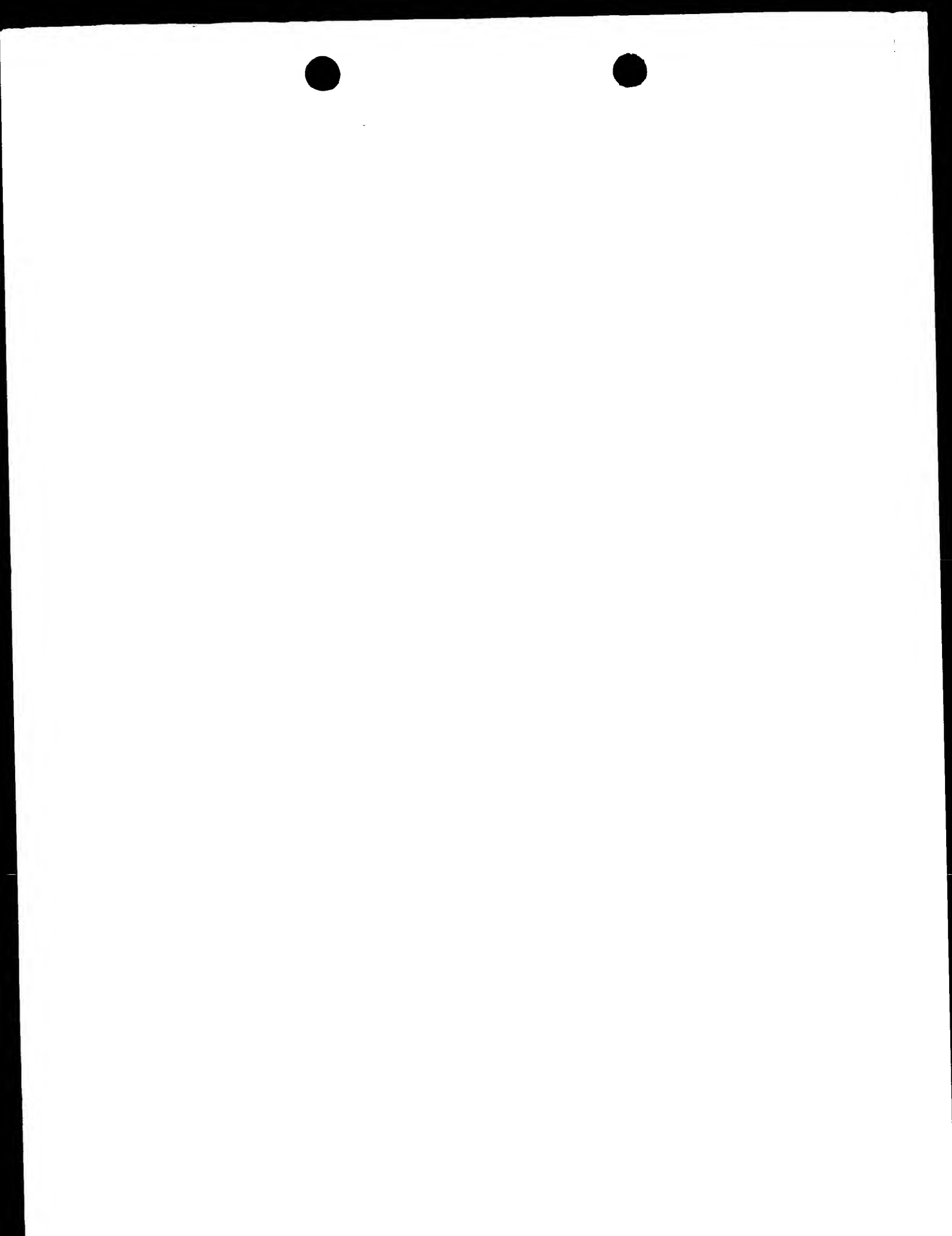
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00405

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713771	A	17-04-1997	AU 7289696 A EP 0861253 A HR 960465 A	30-04-1997 02-09-1998 28-02-1998
WO 9824432	A	11-06-1998	AU 7622698 A	29-06-1998
WO 9850356	A	12-11-1998	AU 7684298 A AU 7661498 A	27-11-1998 27-11-1998



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 10 MAY 2000

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT 978-03166/NF	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/00405	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/01/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/01/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K31/40		
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCH...		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 20/08/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 09.05.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Beeck, M Tel. Nr. +49 89 2399 8473 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/00405

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-32 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-32 eingegangen am 02/09/1999 mit Schreiben vom 02/09/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

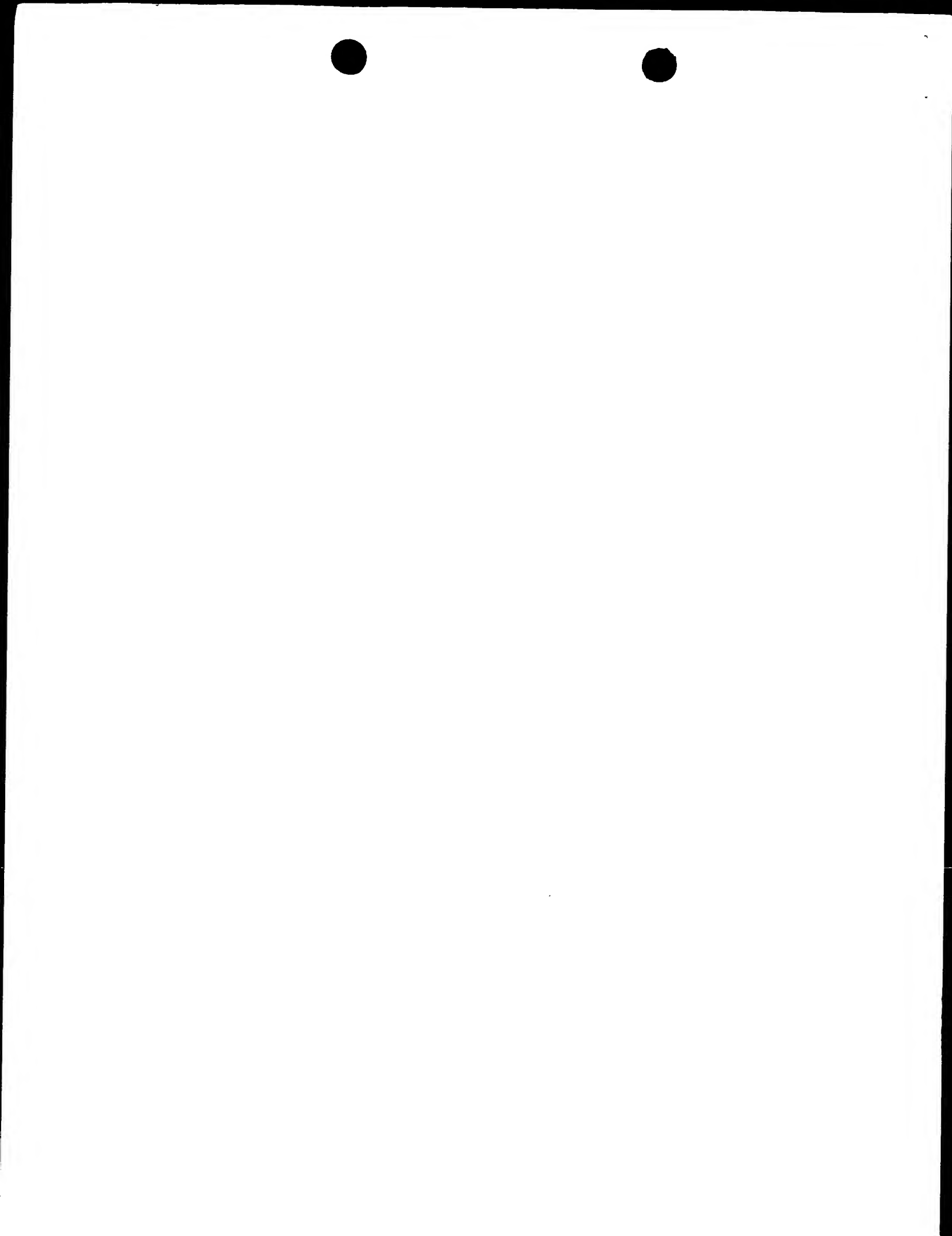
3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-28,30-32
	Nein: Ansprüche	29
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-28,30-32
	Nein: Ansprüche	29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	18-23,29,31,32
	Nein: Ansprüche	1-17,24-28,30 siehe Abschnitt V



2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

ABSCHNITT V:

- 1) Die vorliegende Prüfung wurde unter der Annahme durchgeführt, dass die Priorität gültig ist.
- 2) Wird der Patentanspruch 29 im Lichte der Beschreibung auf S. 10, 3. Absatz ausgelegt, so sind die Inhibitoren beispielsweise die aus dem Dokument MOHAMMADI ET AL, SCIENCE, Bd. 276, S. 955-960 (1997) (im Recherchenbericht genannt) bekannten.

Pharmazeutische Zusammensetzungen dieser Inhibitoren werden aber eben durch dieses Dokument offenbart.

Daher ist der Gegenstand des Patentanspruchs 29 nicht neu.

- 3) Für die übrigen Patentansprüche ist der nächstliegende Stand der Technik das Dokument WO 97 13771.

Die im Dokument WO 97 13771 beschriebenen Verbindungen sind Inhibitoren der Rezeptortyrosinkinasen c-erbB-2, EGF-R und PDGF-R und werden zur Behandlung von u.a. Krebs verwendet (siehe S. 7, 4. und 7. Absatz, und die Patentansprüche).

Davon unterscheidet sich der Gegenstand des Patentanspruchs 1 darin, dass die Rezeptortyrosinkinase FGFR-4 ist.

Da es für den Fachmann nicht nahegelegen hat, dass auch die Inhibierung der FGFR-4 Tyrosinkinase zur Behandlung von u.a. Krebs geeignet ist, beruht der Gegenstand des Patentanspruchs 1 und der davon abhängigen Ansprüche 2 bis 17 auf einer erfinderischen Tätigkeit.

- 4) Der Gegenstand der Patentansprüche 18 bis 28 und 30 bis 32 liegt noch ferner vom Dokument WO 97 13771, so dass auch dieser auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

- 5) Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-17, 24-28 und 30 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische bzw. diagnostische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen oder diagnostischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels bzw. Diagnostikums für eine neue medizinische oder diagnostische Anwendung gerichtet sind.

ABSCHNITT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 98 24432	11.6.98	2.12.97	5.12.96
WO 98 50356	12.11.98	7.5.98	7.5.97

ABSCHNITT VIII:

- 1) Konkrete Beispiele für Inhibitoren von FGFR-4 werden nicht genannt, wenn man von dem allgemeinen Verweis auf S. 10, 3. Absatz, auf das Dokument von Mohammadi absieht.

Um die Erfordernisse des Artikels 5 PCT zu erfüllen, sollten die in diesem Dokument beschriebenen Inhibitoren in die Beschreibung der Anmeldung aufgenommen werden (siehe die PCT-Richtlinien CII, 4.17).

- 2) Der Patentanspruch 29 ist nicht klar, da er sich auf Inhibitoren nach den Ansprüchen 1 bis 17 bezieht. Diese Ansprüche sind aber keine

Produktansprüche, sondern Verwendungsansprüche.

Dasselbe gilt für den Patentanspruch 10, soweit er sich auf die Ansprüche 1 bis 3 bezieht, in denen der Begriff "Mutation" nicht enthalten ist.

Geänderte Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem Inhibitor von FGFR-4 für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Rezeptortyrosinkinase(RTK)-Überfunktions-bedingten Beeinträchtigungen, insbesondere von Krebs.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor ein Kinase-inaktiver Rezeptor ist.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Überexpression und/oder veränderte Aktivität von FGFR-4 erniedrigt und/oder inhibiert wird.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Überexpression und/oder veränderte Aktivität von FGFR-4 durch eine Mutation des FGFR-4 ausgelöst wird.
5. Verwendung gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei der Mutation um eine oder mehrere Punktmutationen handelt.
6. Verwendung gemäß Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation(en) in der Transmembrandomäne von FGFR-4 auftritt.
7. Verwendung gemäß Anspruch 5 oder Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation(en) zu einem Austausch einer hydrophoben gegen eine hydrophile Aminosäure führt.
8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Punktmutation an AS-Position 388 im FGFR-4-Molekül auftritt.

9. Verwendung gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Punktmutation an AS-Position 388 zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin führt (G388R).
10. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation(en) Keimbahnmutationen sind.
11. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche für die Behandlung von Krebs und/oder auf Hyperproliferation und/oder Invasion zurückzuführende Erkrankungen, insbesondere von Carcinomen, insbesondere durch Inhibition der Metastasenbildung.
12. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche für die Behandlung von Brustkrebs.
13. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Squamous-Zell-Carcinomen.
14. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Glioblastomen.
15. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Neuroblastomen.
16. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Gebärmutterkrebs.
17. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor einen mutierten FGFR-4 hemmt.
18. Mutierter FGFR-4, der zu einer Überexpression und/oder veränderten Aktivität des Rezeptors in Zellen führt.



02-09-1999 Zeichen:
Anmelder:
Unser Zeichen:
Datum:

PCT/EP99/00405
Max-Planck-Gesellschaft...
PCT97/03166/nf
02.09.1999

PCTEP 99 00405

CLMSPAMD19

19. Mutierter FGFR-4 nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine hydrophobe Aminosäure im Wildtyp-Rezeptor gegen eine hydrophile Aminosäure im mutierten Rezeptor ausgetauscht wurde.
20. Mutierter FGFR-4 nach Anspruch 18 oder 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation eine Punktmutation ist und vorzugsweise in der Transmembrandomäne auftritt.
21. Mutierter FGFR-4 nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Punktmutation an Position 388 auftritt, und vorzugsweise ein Glycin durch Arginin ersetzt wird.
22. DNA-Molekül, umfassend eine Sequenz, die für einen mutierten FGFR-4 nach einem der Ansprüche 18 bis 21 kodiert.
23. RNA-Molekül, umfassend eine RNA-Sequenz, die für einen FGFR-4 nach einem der Ansprüche 18 bis 21 kodiert.
24. Verwendung der Sequenzen gemäß einem der Ansprüche 22 und 23 in einer Diagnose von Krankheiten, insbesondere von Krebs.
25. Verwendung nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Sequenz spezifisch die Punktmutation an Position 388 des FGFR-4 detektieren kann.
26. Diagnoseverfahren, insbesondere zur Differentialdiagnose von Krebs, umfassend den Schritt des Nachweisens eines mutierten FGFR-4-Proteins oder eine Nukleinsäure, kodierend hierfür, in einer Patientenprobe.
27. Diagnoseverfahren nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß Nukleinsäure des Patienten mit einer DNA und/oder RNA in Kontakt gebracht wird, so daß ein Signal erhalten wird, das die Anwesenheit und/oder Abwesenheit von mutiertem

FGFR-4 anzeigt, und/oder Nukleinsäure des Patienten mit PCR amplifiziert und anschließend mit einem Restriktionsenzym gespalten wird, dessen Erkennungssequenz von der Mutation betroffen ist und/oder Protein des Patienten wird mit einem Antikörper in Kontakt gebracht, der spezifisch ist für das mutierte Protein.

28. Verfahren zum Screenen auf das Vorliegen einer genetischen Prädisposition für das Auftreten von Krebs und/oder anderen Erkrankungen umfassend den Schritt des Nachweisens eines mutierten FGFR-4-Proteins oder einer Nukleinsäure, kodierend hierfür, oder einer amplifizierten FGFR-4-Nukleinsäure, in einer Patientenprobe.
29. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den Inhibitor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17.
30. Screeningverfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der Tyrosinkinaseaktivität, wobei der Rezeptor nach einem der Ansprüche 18 bis 21 mit potentiellen Inhibitoren in Kontakt gebracht wird und die Tyrosinkinaseaktivität in Abwesenheit und/oder Anwesenheit des Inhibitors ermittelt wird.
31. Mutierter FGFR-4, vorzugsweise nach einem der Ansprüche 18 bis 21, als Target in der Krebstherapie
32. Antikörper, der mit einem mutierten FGFR-4-Protein nach einem der Ansprüche 18 bis 21 spezifisch reagiert.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

A61K 31/40, C07K 14/71, 16/28, C12N
15/12, C12Q 1/68

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/37299

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

29. Juli 1999 (29.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/00405

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Januar 1999 (22.01.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 02 377.4

22. Januar 1998 (22.01.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG
DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse
2, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ULLRICH, Axel [DE/DE];
Türkenstrasse 104, D-80799 München (DE). BANGE, Jo-
hannes [DE/DE]; Schmuzerstrasse 5, D-81373 München
(DE). KNYAZEY, Pjotr [DE/DE]; Hubertusstrasse 66,
D-82131 Gauting (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR &
SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG,
TJ, TM), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(54) Title: USE OF INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF DISORDERS RELATED TO RTK HYPERFUNCTION, ESPECIALLY
CANCER

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON INHIBITOREN FÜR DIE BEHANDLUNG VON RTK-ÜBERFUNKTIONS-BEDINGTEN
STÖRUNGEN, INSBESONDERE VON KREBS

(57) Abstract

The invention relates to the use of inhibitors for the treatment and/or prevention of diseases resulting from increased receptor tyrosine kinase activity, especially cancer. Use concerns particularly the inhibition or reduction of over-expression and/or altered activity of receptor tyrosine kinases (RTKs). Such changes in the activity of receptor tyrosine kinase may be triggered particularly by a mutation of the FGFR-4, which mutation is especially a point mutation in the transmembrane domain of FGFR-4 and leads to an exchange of a hydrophobic for a hydrophilic amino acid. The invention further relates to the use of an inhibitor directed against FGFR-4 for the treatment and/or prevention of cancer. The invention also relates to a mutated FGFR-4 causing overexpression and/or altered activity in cells. The invention finally relates to a DNA and RNA sequence of a mutated FGFR-4 molecule, a pharmaceutical composition comprising the inhibitor described above, and a diagnostic and screening method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die Folge einer erhöhten Rezeptortyrosinkinaseaktivität sind, insbesondere von Krebs. Die Verwendung ist insbesondere auf eine Inhibition oder Verminderung der Überexpression und/oder veränderten Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) gerichtet. Insbesondere kann diese veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase durch eine Mutation des FGFR-4 ausgelöst werden, wobei diese Mutation insbesondere eine Punktmutation in der Transmembrandomäne von FGFR-4 ist und zu einem Austausch einer hydrophoben gegen eine hydrophile Aminosäure führt. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines gegen FGFR-4 gerichteten Inhibitors für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs. Weiterhin betrifft die Erfindung einen mutierten FGFR-4, der zu einer Überexpression und/oder veränderten Aktivität in Zellen führt. Die Erfindung betrifft schließlich eine DNA- und RNA-Sequenz eines mutierten FGFR-4-Moleküls. Schließlich betrifft die Erfindung außerdem eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den Inhibitor, wie oben beschrieben, ferner ein Diagnose- und Screeningverfahren.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SN	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Inhibitoren für die Behandlung von RTK-Überfunktions-bedingten Störungen, insbesondere von Krebs

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die Folge einer erhöhten Rezeptortyrosinkinase-aktivität sind, insbesondere von Krebs. Die Verwendung ist insbesondere auf eine Inhibition oder Verminderung der Überexpression und/oder veränderten Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) gerichtet. Insbesondere kann diese veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase durch eine Mutation des FGFR-4 ausgelöst werden, wobei diese Mutation insbesondere eine Punktmutation in der Transmembrandomäne von FGFR-4 ist und zu einem Austausch einer hydrophoben gegen eine hydrophile Aminosäure führt. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Inhibitoren der FGFR-Kinasen, insbesondere für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs. Weiterhin betrifft die Erfindung einen mutierten FGFR-4, der zu einer Überexpression und/ oder veränderten Aktivität in Zellen führt. Die Erfindung betrifft schließlich eine DNA- und RNA-Sequenz eines mutierten FGFR-4-Moleküls. Schließlich betrifft die Erfindung außerdem eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den Inhibitor, wie oben beschrieben, ferner ein Diagnose- und Screeningverfahren.

Zellwachstum ist ein sorgfältig regulierter Prozeß in Abhängigkeit von den speziellen Bedürfnissen eines Organismus. Bei einem jungen Organismus überwiegt die Zellteilungsrate die Absterberate von Zellen, was zu einer Größenzunahme des Organismus führt. Bei einem ausgewachsenen Organismus sind die Neubildungen von Zellen und der Zelltod so ausgewogen, daß ein "Fließgleichgewicht" entsteht. In seltenen Fällen bricht jedoch die Kontrolle der Zellvermehrung zusammen und die Zellen beginnen zu wachsen und sich zu teilen, obwohl in dem Organismus kein spezieller Bedarf für eine höhere Anzahl von Zellen dieses Typs besteht. Dieses unkontrollierte Zellwachstum ist die Ursache von Krebs. Faktoren, die das unkontrollierte Zellwachstum, teilweise verbunden mit Metastasenbildung, hervorrufen können, sind oftmals chemischer Natur, können jedoch auch physikalischer Art, wie z.B. radioaktive Strahlung, sein. Eine andere Ursache für die Auslösung von Krebs sind genetische Eigenheiten oder Mutationen in einem bestimmten Organismus, die früher oder später dazu führen, daß Zellen entarten.

Die Verfahren, die das normale Wachstum und die Differenzierung z.B. in der Brust steuern, konnten bis jetzt noch nicht in zufriedenstellender Weise aufgeklärt werden. Zusätzlich zu einer hormonellen Steuerung kommt ein komplexes Netzwerk verschiedener, lokal erzeugter Wachstumsfaktoren hinzu, die in die Entwicklung der Brustdrüsenzellen eingreifen. Die genauen Ursachen für die Entstehung von Krebs bei Brustdrüsenzellen ist genauso unklar und unbekannt wie auch vielfältig, entsprechend der Situation bei anderen Zellen. Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen scheinen eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese des Brustkrebs zu spielen. Zusätzlich kann eine verstärkte Stimulation durch regulatorische Faktoren, die in genetisch veränderten Zellen auftreten, zu einem vermehrten Fortschreiten des Zellwachstums führen.

Zur Therapie von Krebs stehen gegenwärtig im wesentlichen zwei Alternativen zur Verfügung. Entweder gelingt es, die Krebszellen durch einen operativen Eingriff vollständig aus dem erkrankten Organismus zu entfernen, oder es wird versucht, die entarteten Zellen im Organismus unschädlich zu machen, wie beispielsweise durch Verabreichung von Medikamenten (Chemotherapie) oder durch physikalische Therapieverfahren, wie Bestrahlung.

Bei der Chemotherapie werden häufig Medikamente eingesetzt, die in irgendeiner Form in den DNA-Stoffwechsel eingreifen und schnell wachsende Zellen, die eine höhere DNA-Stoffwechselleistung erbringen müssen, stärker schädigen als Zellen, die sich nicht oder nur langsam teilen. Ein schwerwiegender Nachteil vieler Chemotherapeutika ist jedoch die geringe Spezifität der verwendeten Wirkstoffe, was zur Folge hat, daß auch gesunde Zellen bei der Chemotherapie geschädigt werden. Diese geringe Spezifität der Wirkstoffe fordert weiterhin, daß deren Dosierung jeweils so erfolgen muß, das möglichst wenig gesunde Zellen bei gleichzeitiger Abtötung der Krebszellen geschädigt werden. Dies ist oftmals nicht möglich und der krebserkrankte Patient stirbt aufgrund der sich immer weiter ausbreitenden Krebszellen, die im Endstadium den Ausfall lebenswichtiger Funktionen herbeiführen.

Es wird angenommen, daß die Überexpression und/oder veränderte Aktivität bestimmter Wachstumsfaktorrezeptoren zu dem verstärkten Wachstum vieler Neoplasmen, einschließlich bei Brustkrebs, beitragen. Zum Beispiel wurde die Überexpression von EGFR, d. h. dem Epidermal Factor Receptor, oder dem ERB B-2-Rezeptor in Brusttumoren mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Auch FGF- (historisch: Fibroblast

Growth Factor) Proteine könnten eine Rolle bei der Entwicklung von Krebs in Brustdrüsen oder von anderem Krebs spielen; die Ergebnisse in dieser Richtung widersprechen sich jedoch oder sind nicht konklusiv.

Die FGFs bilden eine große Familie von peptidregulatorischen Faktoren, von denen bis jetzt 9 Mitglieder bekannt sind. Acht davon sind in Menschen gut charakterisiert worden (Basilico und Moscatelli, 1992; Coulier et al., 1993). Die FGFs wirken über Hochaffinitäts-Tyrosinkinaserzeptoren, die durch mindestens vier unterschiedliche Gene kodiert werden. Die FGFs sind weiterhin multifunktionelle, regulatorische Peptide, die nicht nur auf die Tumorgenese wirken könnten, sondern auch bei kardiovaskulären Krankheiten, dem Aufbau nach einer Gewebsverletzung, der Neurobiologie und der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielen könnten. Die sauren und basischen FGFs (aFGF und bFGF) waren die ersten und sind die am besten gekennzeichneten Familienmitglieder. In vivo konnte für FGFs z. B. nachgewiesen werden, daß sie an einer mesodermalen Induktion in der Embryogenese teilnehmen (Slack et al., 1987; Kimelman et al., 1988), wie auch eine Beteiligung an der Angiogenese (Thomas et al., 1985; Thompson et al., 1989; Folkmann and Klagsbrun, 1987).

Für die korrespondierenden Rezeptoren (FGFRs) wurden vier ähnliche Gene identifiziert, die für sie kodieren. Diese Gene kodieren strukturell verwandte Proteine mit einer extrazellulären Domäne, die aus drei Immunglobulinloops besteht und einem sauren Anteil, einer hydrophoben Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Domäne, welche eine Tyrosinkinaseaktivität einschließt. Für zwei dieser Gene, FGFR-1 und FGFR-2, konnte gezeigt werden, daß sie multiple Transkripte haben, die über alternatives Spleißen entstehen (Givol und Yayon, 1992 und Johnson und Williams 1993). Spleiß-Varianten, die sich aus diesen Genen ergeben, unterscheiden sich im Hinblick auf die Anzahl der Immunglobulin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Bereich des Rezeptors und in der Sequenz für die zweite Hälfte der dritten Immunglobulindomäne, die aus alternativen Exons entstehen kann. Außerdem können Transmembran- und Juxtamembran-Verkürzungen oder Deletionen auftreten, die sekretierte oder Kinase-inaktive Proteinprodukte erzeugen können.

Für FGFR-3 konnten alternative Transkripte und entsprechende Isoformen gefunden werden, aber für FGFR-4 gibt es nur ein einziges bekanntes Proteinprodukt. Aufgrund der

Vielzahl der FGFR-Gene und Transkripte und des Mangels vieler Proteinprodukte an einer Spezifität für bestimmte FGFs ist es schwierig, die Wirkung eines spezifischen Liganden auf einen spezifischen Rezeptor zu bestimmen. Korrelationen zwischen spezifischen FGF-Rezeptoren und bestimmten Krankheiten sind daher nur sehr schwierig zu etablieren, geschweige denn eine Korrelation eines bestimmten Wirkungsmechanismus eines bestimmten Rezeptors mit einer Krankheit. Dementsprechend schwierig ist es, Krankheiten, insbesondere das komplexe Krankheitsbild Krebs, wirksam unter Ausnutzung der FGFRs zu therapieren.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Möglichkeit zur Behandlung und/oder Prophylaxe von körperlichen Beeinträchtigungen anzugeben, an deren Entstehung Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) beteiligt sind, insbesondere von Krebs. Insbesondere ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Überexpression und/oder veränderte, beispielsweise konstitutive Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen zu hemmen und/oder zu erniedrigen.

Es ist ferner eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase eines mutierten FGFR-4 zu hemmen oder zu erniedrigen.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine weitere RTK anzugeben, die an der Krebsentstehung und/oder Metastasierung beteiligt ist. Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine DNA-Sequenz oder korrespondierende RNA-Sequenz der RTK anzugeben.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, verbesserte Diagnose- oder Differentialdiagnose- und Screeningverfahren anzugeben.

Schließlich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine pharmazeutische Zusammensetzung anzugeben, mit der insbesondere Krebs behandelt werden kann.

Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche gelöst. Die abhängigen Ansprüche geben bevorzugte Weiterbildungen der Erfindung an.

Zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung werden im folgenden die hierin verwendeten Begriffe näher erläutert.

Unter "Inhibitor" wird jede Substanz verstanden, die die RTK hemmt oder ihre Aktivität erniedrigt. Dabei kann es sich um eine gegen die RTK gerichtete niedermolekulare Substanz, einen Kinase-inaktiven Rezeptor oder einen Anti-Rezeptor-Antikörper handeln.

Unter einem "Kinase-inaktiven Rezeptor" wird ein Rezeptor verstanden, der keine Tyrosinkinaseaktivität mehr besitzt.

Unter "Rezeptortyrosinkinase" wird jeder Rezeptor verstanden, der Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Der Ausdruck umfaßt Wachstumsfaktorrezeptoren, die Tyrosinkinaseaktivität besitzen, wie auch HER2 oder die met-Rezeptoren.

Unter "RTK-Überfunktion" wird eine Überexpression (siehe unten) und/oder veränderte Aktivität (siehe unten) verstanden.

"Defekte Signalübertragsaktivitäten" bedeutet, daß ein mutierter Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, ein extrazelluläres Wachstumssignal oder ein anderes Signal in der Weise in ein intrazelluläres Signal umzusetzen, wobei diese defekte Signalerzeugung nicht mehr von der Anwesenheit eines Liganden, beispielsweise des Wachstumsfaktors, abhängt.

"Wachstumsfaktor" bedeutet jede mitogene Chemikalie, üblicherweise ein Polypeptid, das u.a. von normalen und/oder transformierten Säugerzellen ausgeschieden wird, und das eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Zellwachstums spielt, insbesondere bei der Stimulierung der Proliferation der Zellen und dem Aufrechterhalten ihrer Lebensfähigkeit. Der Begriff "Wachstumsfaktor" umfaßt z.B. den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den von Plättchen stammenden Wachstumsfaktor (PDGF) und den Nervenwachstumsfaktor (NGF), wie auch den FGF, also den Fibroblastenwachstumsfaktor.

Unter "mutierter Rezeptortyrosinkinase" wird eine Rezeptortyrosinkinase verstanden, die im Vergleich zu dem Wildtyp-Rezeptor eine Strukturänderung enthält, so daß der Rezeptor eine andere, z.B. nicht mehr regulierbare Tyrosinkinaseaktivität als der Wildtyp-Rezeptor besitzt. Eine Klasse von Mutationen führt zu einer veränderten Aktivität der RTK.

Unter "Wildtyp-Wachstumsfaktorrezeptor" bzw. "Wildtyp"-Rezeptor wird ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktorrezeptor oder Rezeptor verstanden, der die nicht mutierte Aminosäuresequenz trägt. Der "Wildtyp" entspricht der in der Population am häufigsten vorkommenden Rezeptorvariante.

Unter "extrazellulärer Domäne" des Wachstumsfaktorrezeptors oder Rezeptors wird der Teil des Rezeptors verstanden, der normalerweise aus der Zelle in die extrazelluläre Umgebung herausragt. Die extrazelluläre Domäne umfaßt beispielsweise den Teil des Rezeptors, an dem ein Wachstumsfaktor oder ein anderes Molekül (Ligand) bindet.

Unter "Transmembranregion" des Wachstumsfaktorrezeptors oder Rezeptors wird der hydrophobe Anteil des Rezeptors verstanden, der normalerweise in der Zellmembran der Zelle lokalisiert ist, die den Rezeptor exprimiert.

Unter "Tyrosinkinasedomäne" oder "zytoplasmatischer Domäne" des Wachstumsfaktorrezeptors oder Rezeptors wird der Teil des Rezeptors verstanden, der sich normalerweise innerhalb der Zelle befindet, und der die Transphosphorylierung von Tyrosinresten bewirkt.

Unter "einer wirksamen Menge" wird eine Menge der erfindungsgemäßen Zusammensetzung verstanden, die den gewünschten therapeutischen Effekt erzielen kann.

Unter "Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)" wird ein mitogenes Polypeptid verstanden, daß das Wachstum und andere Eigenschaften von Zellen, u. a. von Fibroblasten, beeinflußt.

Unter "Überexpression" wird eine vermehrte Herstellung von RTK-Protein durch eine Zelle im Vergleich zum Wildtyp verstanden. Dies kann z.B. durch Genamplifikation des RTK-Gens ausgelöst werden und zu einer überschüssigen, unkontrollierten Zellteilungsaktivität führen.

Unter "veränderter Aktivität" wird eine ständige Aktivität eines durch Wachstumsfaktorrezeptoren vermittelten Signalübertragungswegs verstanden. So ist bei einer veränderten RTK die Kinaseaktivität auch dann vorhanden, wenn kein Ligand vorliegt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß ein mutierter FGFR-4 zu einer Überexpression und/oder veränderter Aktivität der entsprechenden Rezeptortyrosinkinase in Zellen und damit zu Krebs führen kann.

Wachstumsfaktorrezeptoren spielen bei der Entstehung und Vermehrung von menschlichen Krebszellen eine entscheidende Rolle. Bei gesunden Zellen sind die Wachstumsfaktorrezeptoren u.a. an der Kontrolle des Zellwachstums, aber auch an der Differenzierung, Zellmigration etc. beteiligt. Das eigentliche Signal zur Zellteilung ist der Wachstumsfaktor, der in Abhängigkeit von den Bedürfnissen des Organismus gebildet wird. Der Rezeptor übernimmt die Funktion der Signalübertragung, d. h. er ist an der Umsetzung des extrazellulären Wachstumssignals in Zellteilungsaktivität im Inneren der Zelle beteiligt. Bei vielen Wachstumsfaktorrezeptoren spielt deren Fähigkeit, nach Bindung des Wachstumsfaktors an die extrazelluläre Domäne Phosphatreste an Tyrosinreste in Proteinen zu übertragen, eine entscheidende Rolle. Diese Rezeptoren werden auch als Rezeptortyrosinkinasen bezeichnet. Eine Übersicht über Rezeptortyrosinkinasen befindet sich in Yarden, Y. und Ullrich A., Rev. Biochem. 1988, 57, 443 - 78. Die Dimerisierung dieser Wachstumsfaktorrezeptoren nach Bindung des Wachstumsfaktors ist ein weiterer wichtiger Vorgang bei dem Prozeß der Signalübertragung. Die Umwandlung eines extrazellulären Signals in ein intrazelluläres Signal unter Vermittlung von Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität läßt sich in die folgenden fünf Stufen zerlegen:

1. Die Bindung des Wachstumsfaktors (auch als Ligand bezeichnet) an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors induziert eine Konformationsänderung; diese bewirkt
2. Dimerisierung von Rezeptoren mit veränderter Konformation; mit
3. gleichzeitiger Induktion einer Kinaseaktivität;
4. Transphosphorylierung von Tyrosinresten in dem Rezeptordimer, die wiederum eine aktivierte Rezeptorkonformation erzeugt und stabilisiert; und
5. Phosphorylierung von Polypeptidsubstraten und Wechselwirkung mit zellulären Faktoren.

Eine unkontrollierte Überfunktion dieser Signalübertragungskette beispielsweise aufgrund der Überexpression oder eine veränderte Aktivität des Rezeptors kann unter anderem zu einer überhöhten Teilungsaktivität der entsprechenden Zelle führen und im Extremfall zu einer entarteten Krebszelle. Eine Übersicht über Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Funktion bei der Signalübertragung von dem extrazellulären in das intrazelluläre Milieu, sowie der mögliche Einfluß von abnormal exprimierten Rezeptoren auf die Krebsentstehung ist in Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990) Cell 61, 203 - 212 gegeben.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß es in der oben erläuterten, fünfstufigen Signalübertragungskette durch einen mutierten FGFR-4 zu einer gesteigerten Signalübertragungsaktivität kommt, an deren Entstehung die veränderte Aktivität mutierter RTK maßgeblich beteiligt ist.

Gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung wird daher mindestens ein Inhibitor einer Rezeptortyrosinkinase für die Behandlung und/oder Prophylaxe von RTK-Überfunktionsbedingten Beeinträchtigungen, insbesondere von Krebs, verwendet. Darüber hinaus können erfindungsgemäß auch Krankheiten bzw. körperliche Beeinträchtigungen beseitigt bzw. gelindert werden, die Folge einer auf eine gesteigerte Signalübertragung zurückzuführenden Hyperproliferation von Gewebe und/oder gesteigerten Invasivität von Gewebe sind.

Als Inhibitor kann neben niedermolekularen Substanzen beispielsweise mindestens ein Kinase-inaktiver Rezeptor verwendet werden. Durch die Verwendung des Inhibitors, z.B. des Kinase-inaktiven Rezeptors kann die veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase gehemmt und/oder erniedrigt werden. Wie bereits früher ausgeführt ist die Überexpression und/oder veränderte Aktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren ein wichtiger Faktor bei der Auslösung oder dem Fortschreiten von Krebs. Die Überexpression von EGFR oder des Erb B-2-Rezeptors in Brusttumoren wurde z. B. mit einer schlechten Prognose assoziiert (siehe oben). Daher ist eine Hemmung dieser Überexpression und/oder veränderten Aktivität ein wichtiger Bestandteil bei der Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs. FGFR-4 wird während der Embryogenese gewebespezifisch abgeschaltet. Dennoch findet er sich bei 30% der Brustkrebspatientinnen; im Gewebe von Gesunden ist er nicht nachweisbar. Der Einsatz von Inhibitoren für Rezeptortyrosinkinasen führt zu einer Erniedri-

gung oder vollständigen Inhibition der Überexpression und/oder veränderten Aktivität. Ebenso führt der Einsatz Kinase-inaktiver Rezeptoren zu einer Erniedrigung und/oder vollständigen Inhibition der Aktivität der Rezeptortyrosinkinasen, da die Kinasefunktion des Heterodimers nicht mehr zu einer Signalübertragung fähig ist. Die Wirkung Kinase-inaktiver Rezeptoren beruht darauf, daß nicht funktionelle Heterodimere gebildet werden (Verdünnungseffekt). Eine fehlende Signalübertragung führt zu einer Verhinderung der Weiterleitung des überexprimierten und/oder veränderten aktiven Signals, wodurch verhindert wird, daß das Signal in eine biologische Antwort der Zelle umgesetzt wird. Dadurch kann durch diese Inhibition der Rezeptortyrosinkinase oder durch diese Kinase-inaktiven Rezeptoren wirksam und in positiver Weise in die Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs eingegriffen werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die FGFR-4-Mutation auch in der Keimbahn von gesunden Menschen vorkommt. Es wird davon ausgegangen, daß die Keimbahnmutation zu einer genetischen Prädisposition führt, die die betroffenen Personen anfällig macht gegenüber dem Ausbruch verschiedener Erkrankungen. Im Zusammenhang mit der Krebsentstehung wird angenommen, daß die erhöhte Expression des mutierten Rezeptors im Tumorgewebe an der Kanzerogenese beteiligt ist. Die Keimbahnmutation wird weiterhin als Prädisposition u.a. für folgende Erkrankungen angesehen: Arteriosklerose, Leukämie, Lymphome, Leberzellcarcinome sowie Cholangiocarcinome.

Demzufolge stellt die vorliegende Erfindung einen weiteren genetischen Marker zur Verfügung, der sich als äußerst hilfreich in der Diagnose und Früherkennung verschiedener Erkrankungen und Anfälligkeit gegenüber diesen erweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure, die FGFR-4 kodiert, in Patientenmaterial, wobei insbesondere Mutationen der Rezeptor-kodierenden Nukleinsäure nachgewiesen werden. Dies kann beispielsweise durch Hybridisierung mit Oligonukleotidproben erfolgen, die spezifisch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Mutation, insbesondere einer Punktmutation, anzeigen können. Dabei wird beispielsweise ein "mismatch" zwischen mutierter Nukleinsäure und Oligonukleotidprobe so ausgenutzt, daß bei vorliegendem "mismatch" eine Hybridisierung nicht erfolgt und somit ein Signal ausbleibt. Alternativ können Mutationen auch durch Amplifikation der Nukleinsäure mit spezifischen FGFR-4-PCR-Primern und anschließender Spal-

tung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen nachgewiesen werden. Betrifft beispielsweise eine Mutation die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease, indem beispielsweise die mutierte Erkennungssequenz von der Restriktionsnuklease nicht mehr als Spaltstelle erkannt wird, führt dies zu einem anderen Restriktionsfragment als im nicht-mutierten Wildtyp. Mit Hilfe der PCR lassen sich gezielt Restriktionsfragmente nachweisen, so daß in dem genannten Fall beispielsweise ein größeres Restriktionsfragment in der Mutante vorliegt im Vergleich zum Wildtyp. Alternativ kann jedoch auch eine Mutation zur Entstehung einer neuen Restriktionsspaltstelle führen, wobei sich ein "Wildtyp-Fragment" nach Spaltung mit dem entsprechenden Enzym in der Mutante verkleinert. Die Mutation in der Transmembrandomäne des FGFR-4, an Position 388 der Sequenz, wie in der EMBL GenBank /DDBJ unter X57205 hinterlegt, die zu einem Austausch von Gly im Wildtyp gegen Arg in der Mutante führt, betrifft die Erkennungssequenz GGWCC der Restriktionsendonuklease BstNI. Dadurch entstehen zwei neue Restriktionsfragmente von 80 und 29 bp, die u.a. durch Restriktionsanalyse nachgewiesen werden können.

Gemäß der vorliegenden Erfindung konnte ferner gezeigt werden, daß eine Überexpression und insbesondere eine veränderte Aktivität der RTK zu einer vermehrten Invasivität, d.h. einer verstärkten Metastasenbildung führt. Da die Metastasenbildung eines der Hauptprobleme von Krebs ist, bedeutet dies, daß die Inhibition oder Erniedrigung der Überexpression und/oder veränderten Aktivität zu einem wirksamen Mittel bei der Bekämpfung von Krebs wird, wobei insbesondere die Metastasenbildung inhibiert wird.

Mögliche Inhibitoren sind beispielsweise beschrieben in Mohammadi et al. (1997).

Vorzugsweise wird gemäß der Erfindung in eine Überexpression und/oder veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase eingegriffen, die durch eine Mutation des FGFR-4 ausgelöst wird. Bei dieser Mutation kann es sich um eine oder mehrere Punktmutationen handeln. Insbesondere tritt die Mutation/die Mutationen in der Transmembrandomäne von FGFR-4 auf, wobei insbesondere eine hydrophobe gegen eine hydrophile Aminosäure ausgetauscht wird.

Es ist bereits bekannt, daß Punktmutationen, die zu einem Austausch hydrophober zu hydrophiler Aminosäuren in FGFR-3 geführt haben, mit bestimmten Krankheiten assoziiert sind. So wurde z.B. eine veränderte Aktivität des Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor 3

durch eine Punktmutation in der Transmembrandomäne bei der Achondroplasia gefunden. Die Achondroplasia, bei der es sich um die am häufigsten auftretende genetische Form des Zwergenwuchses handelt, ist eine autosomale dominante Störung, die im wesentlichen auf einem Defekt im Reifungsprozeß bestimmter Knochen beruht. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Achondroplasia durch eine Gly- zu Arg-Substitution in der Transmembrandomäne des FGFR-3 ausgelöst wird. Es konnte ferner nachgewiesen werden, daß die Arg-Mutation im FGFR-3 die Kinasefunktion des dimeren Rezeptors aktiviert. Die Arg-Punktmutation führt auch zu einer Liganden-unabhängigen Stimulation der Tyrosinkinaseaktivität von FGFR-3 selbst und zu stark vergrößerten veränderten Niveaus des Phosphotyrosins am Rezeptor. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die molekulare Basis der Achondroplasia eine ungeregelte Signalübertragung durch FGFR-3 ist.

Eine weitere Mutation in der Transmembrandomäne von FGFR-3 ist ein Austausch von Alanin gegen Glutamin. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer anderen Krankheit, nämlich zu Crouzon mit Acanthosis nigricans.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß Mutationen in FGFR-4, insbesondere Punktmutationen in der Transmembrandomäne, die zu einem Austausch einer hydrophoben gegen eine hydrophile Aminosäure führen, an der Auslösung und schlechten Prognose von Krebs beteiligt sind, weshalb eine Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen oder die Verwendung Kinase-inaktiver Rezeptoren für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs geeignet sind, wobei die Rezeptortyrosinkinasen aufgrund einer Mutation überexprimieren oder verändert aktiv sind.

Insbesondere konnte für die Punktmutation an Position 388, die zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin führt, nachgewiesen werden, daß durch sie die Rezeptortyrosinkinasen verändert aktiv werden und es dadurch homo- wie heterozygot zu einer Signalübertragung ohne Ligandenstimulation kommt, wodurch wiederum ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen ausgelöst werden kann. Dieses unkontrollierte Wachstum führt im ungünstigsten Fall zu Krebs. Die Transmembrandomäne weist dann die Sequenz (ID Nr. 1) auf:

RYTDI ILYASGS LALAVLL LLARLY,

während die nicht mutierte Domäne die folgende Sequenz (ID Nr. 2) aufweist:

RYTDI ILYASGS LALAVLL LLAGLY.

Es wird angenommen, daß - ohne an eine Theorie gebunden zu sein - die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase, die eine der oben genannten Punktmutationen und insbesondere die Punktmutation an Position 388 trägt, die zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin führt, auf einer Stabilisierung des Rezeptors in einer dimeren Konformation beruht, die aufgrund von Wechselwirkungen zustande kommt, durch die Veränderungen der Transmembrandomäne möglich gemacht wurden. Die verstärkte Bildung eines Liganden unabhängigen Dimers führt zu einer erhöhten Rezeptortyrosinkinaseaktivität und zellulärer Transformation. Andere Möglichkeiten der Einwirkung der Punktmutationen auf die Krebsauslösung können z.B. darin begründet liegen, daß die Mutation sich auf die Signalübertragung von FGFR-4 auswirkt, indem die Rezeptorwanderung durch die Membran verhindert wird, die Rezeptor-Dimerisierung mit sich selbst oder mit anderen FGFRs gestört wird, oder indem die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors beeinflusst wird.

Gemäß der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß 56% von Patienten mit Brusttumoren aus St. Petersburg (Untersuchung von Biopsien) die Mutation an Position 388, die mit einem Austausch von Glycin gegen Arginin verbunden ist, trugen. Davon waren 45% heterozygot und 11% homozygot. Dieser signifikant hohe Anteil legt eine Verbindung zwischen der Punktmutation an Position 388 und der Entstehung von Brustkrebs nahe.

In einer weiteren Untersuchung, in der deutsche Patienten mit Brusttumoren untersucht wurden, zeigten nur 43% der Patienten die Punktmutationen an Position 388. Aus der Untersuchung mit Normalgeweben von Krebspatienten und DNA aus Gewebe gesunder Individuen läßt sich ableiten, daß die Mutation eine Keimbahnmutation ist.

Weiterhin wurde auch genomische DNA und cDNA von Zelllinien untersucht, um den Anteil der Punktmutation an Position 388 zu bestimmen. Die untersuchten Zelllinien stammten von Brusttumoren, normalen Brustepithelial-Zelllinien als Vergleich, dem Squamous-Zellcarcinom, Glioblastomen, Neuroblastomen und Gebärmutterkrebs. Bei allen Zelllinien, außer bei den normalen Brustepithelial-Zelllinien, konnte ein signifikanter Prozentsatz der

Punktmutation an Position 388 im FGFR-4-Molekül gefunden werden. Daher ist die oben erwähnte Verwendung von Inhibitoren bzw. Kinase-inaktiven Rezeptoren besonders für die Behandlung von Carcinomen geeignet. Hier bietet sich insbesondere die Behandlung von Neuroblastomen, Gebärmutterkrebs, Pankreaskrebs, jedoch auch anderer Krebsarten, an.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Inhibitoren, die einen mutierten FGFR-4 hemmen, insbesondere mit der Mutation Gly → Arg an Position 388 in der Transmembrandomäne.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung einen mutierten FGFR-4, der zu einer Überexpression und/oder veränderten Aktivität des Rezeptors in Zellen führt. Vorzugsweise ist dieser mutierte FGFR-4 dadurch gekennzeichnet, daß eine hydrophobe Aminosäure im Wildtyp-Rezeptor gegen eine hydrophile Aminosäure im mutierten Rezeptor ausgetauscht wurde. Besonders bevorzugt ist eine Mutation, die eine Punktmutation ist und in der Transmembrandomäne auftritt. Noch bevorzugter tritt die Punktmutation an Position 388 auf, wobei vorzugsweise ein Glycin durch Arginin ersetzt wird.

Bis jetzt war man in der Fachwelt davon ausgegangen, daß lediglich ein FGFR-4 vorkommt, der nicht mutiert ist. Mutierte FGFR-4 waren nicht bekannt. Es war daher überraschend, daß gemäß der vorliegenden Erfindung festgestellt werden konnte, daß ein mutierter FGFR-4 existiert. Insbesondere konnte gemäß der vorliegenden Erfindung ein Zusammenhang zwischen den Mutationen, insbesondere der Punktmutation an Position 388, und der Entstehung von Krebs nachgewiesen werden. Weiterhin ist die Keimbahnmutation bei gesunden Personen in Zusammenhang mit der genetischen Prädisposition für das Auftreten u.a. von Arteriosklerose in Verbindung gebracht worden.

Die Erfindung betrifft ferner ein DNA-Molekül umfassend eine Sequenz, die für einen mutierten FGFR-4 kodiert. Die Erfindung umfaßt außerdem ein RNA-Molekül, umfassend eine RNA-Sequenz, die für einen mutierten FGFR-4 kodiert. Die obigen Sequenzen können für eine Diagnose von Krebs verwendet werden. Dabei können die Sequenzen spezifisch die Mutationen im FGFR-4 erkennen. Das Vorliegen der Mutation im FGFR-4 wird mit einer schlechten Prognose für die Behandlung des Krebses in Beziehung

gebracht. Grund hierfür könnte ein aggressiveres Wachstumsverhalten des entsprechenden Tumors sein.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Differentialdiagnose von Brustkrebs, wobei die Nukleinsäure des Patienten mit einer der oben beschriebenen DNAs und/oder RNAs in Kontakt gebracht wird, so daß ein Signal erhalten wird, das die Anwesenheit und/oder Abwesenheit von mutiertem FGFR-4 anzeigt. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den Inhibitor oder den Kinase-inaktiven Rezeptor, wie oben beschrieben. Die Erfindung betrifft außerdem ein Screeningverfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der Tyrosinkinaseaktivität, wobei der erfindungsgemäße Rezeptor mit potentiellen Inhibitoren in Kontakt gebracht wird und die Tyrosinkinaseaktivität in Abwesenheit und/oder Anwesenheit des Inhibitors ermittelt wird.

Weiterhin kann der Nachweis auf das Vorliegen einer Mutation auch mittels PCR und nachfolgender Restriktionsenzymspaltung geführt werden, wie oben bereits ausführlicher beschrieben.

Schließlich kommen auch weitere molekularbiologische Diagnoseverfahren in Betracht.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Antikörper, der mit einem mutierten FGFR-4 gemäß der Erfindung spezifisch reagiert. „Spezifisch“ im Sinne der Erfindung bedeutet, daß der erfindungsgemäße Antikörper an den mutierten, jedoch nicht an den nicht-mutierten Rezeptor bindet.

Im folgenden wird die Erfindung durch die Figuren und Beispiele im Detail beschrieben.

Dabei stellt

Fig. 1 SDS-PAGE einer Immunopräzipitation von FGFR-4 dar (der phosphorylierte FGF-Rezeptor 4 ist durch einen Pfeil markiert),

Fig. 2 ein Polyacrylamidgel des mutierten FGFR-4,

Fig. 3 eine Sequenzanalyse der Transmembrandomäne von FGFR-4,

Fig. 4 die Korrelation zwischen der FGFR-4-Mutation G388R und dem Status der Lymphknoten-Metastasierung (n = Anzahl der Patienten; p = P-value) und Fig. 5 die Korrelation zwischen der FGFR-4-Mutation G388R und der rezidiv-freien Überlebenszeit (n = Anzahl der Patienten; p = P-value) dar.

BEISPIELE

Zellkultur. Die humanen Zelllinien MDA-MB-453, ZR 75-1, K562 und SKBr3 wurden von der ATCC bezogen. Die einzelnen Bezugsquellen sind der Tabelle am Schluß zu entnehmen. MBA-MD-453, K562 und ZR 75-1 wurden in RPMI (Gibco, Eggenstein) mit 10 % fötalem Kälberserum (Sigma, Taufkirchen) kultiviert. SKBR3 wurde in McCoy's 5a (Gibco, Egenstein) mit 15 % fötalem Kälberserum kultiviert. Alle Zellkulturmedien enthielten Penicillin/Streptomycin (Sigma, Taufkirchen). Die Zellen wurden bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre und 8 % CO₂ inkubiert.

Klonierung FGFR-4^{388Arg}/wt. Zur Präparation von RNA aus K562 und MDA-MB-453 Zellen wurden $3 \cdot 10^7$ Zellen mit Guanidinium-Isothiocyanat lysiert und durch Ultrazentrifugation in einem CsCl-Gradienten gereinigt. Die cDNA-Synthese erfolgte durch reverse Transkriptase (Boehringer, Mannheim) und jeweils 10 pmol "random Oligonukleotiden" nach Angaben des Herstellers. 0,5 µl wurden in eine nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt.

FGFR-4^{388Arg} und FGFR-4wt wurden durch die PCR-Reaktion amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer eingesetzt: sense-GCTCAGAGGGCGGGCGGGGGTGCCGGCCG; anti-sense CCGCTCGAGTGCCTGCACAGCCTTGAGCCTTGC. Für die PCR-Reaktion wurden eingesetzt: 1,5 U/25 µl Expand-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und Reaktionspuffer laut Angaben des Herstellers; 200 µM dNTP's; 0,01 % v/v Triton X100; 10% v/v DMSO, je 0,2 pmol sense und α-sense Primer. Die folgenden Reaktionsschritte wurden durchgeführt: 35 Zyklen, 94°C 1 min, 64°C 1 min, 72°C 2,5 min. Zur Klonierung von FGFR-4^{388Arg} wurde MDA-MB-453 cDNA eingesetzt und zur Klonierung von FGFR-4wt K562 cDNA. Die PCR-Produkte wurden in den pcDNA3-Vektor (Invitrogen) kloniert. Dadurch konnte sowohl ein FGFR-4 mit der G388R als auch ein Wildtyp-FGFR-4 für weitere Tests erhalten werden.

Amplifikation der Transmembrandomäne des FGFR-4. Folgende Primer wurden verwendet; sense-GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAG; anti-sense-AGAGGGAAGAGG GAGAGCTTCTG. Für die PCR-Reaktion wurden eingesetzt: 1,5 U/25 µl Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und Reaktionspuffer laut Angaben des Herstellers; 200 µM dNTP's; je 0,2 pmol sense und α-sense Primer, 0,5 µl cDNA oder genomische DNA aus Tumor-Biopsien und Zelllinien; folgende Reaktionsschritte wurden durchgeführt: 35 Zyklen; 95°C 45 sec., 72°C 45 sec.

Analyse durch Restriktionsverdau. Aus genomischer oder cDNA wurde die Transmembrandomäne des FGFR-4 wie oben beschrieben amplifiziert. Um Biopsien und Zelllinien auf die G1217A-Mutation durch einen Restriktionsverdau zu untersuchen, wurden die PCR-Produkte mit 5 U/25 µl BstN1 (NEB, Schwalbach/Taunus), 1 h bei 60°C inkubiert. Die DNA-Fragmente des Restriktionsverdaus wurden durch ein 20%iges Polyacrylamidgel getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Analyse des Wildtyprezeptors ergibt ein 109, ein 37 und ein 22 Basenpaare großes Fragment (Spur 4). Durch die Mutation G1217A dagegen entsteht eine weitere Restriktionsschnittstelle für BstN1. Der mutierte Rezeptor zeigt weitere 80 und 29 Basenpaare große Fragmente, während das 109 Basenpaare große Fragment verschwindet (Spur 1: homozygot; Spur 2 und 3: heterozygot) (siehe Figur 2).

Genotypische Analyse von genomischer DNA durch Restriktionsverdau.

Genomische DNA aus den Gewebeproben der primären Tumore wurde durch Standardmethoden isoliert (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., 1995). Um die genomische DNA genotypisch analysieren zu können, wurde die Transmembranregion im FGFR-4 Gen mit folgenden Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert: 5'-GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAG-3' (bp 1129-1142), 5'-AGAGGGAAGAGGGAGAGCTTCTG-3' bp 1275-1297). Für die PCR-Reaktion wurden Ready-to-Go PCR Beats (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet. Folgende PCR-Zyklen wurden benutzt: 3 min bei 95°C, 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 72°C und 5 min bei 72°C. Insgesamt wurden 35 Zyklen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit 5 U/25 µl BstN1 (NEB, Schwalbach/Taunus) 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Die DNA-Fragmente des Restriktionsverdaus wurden durch ein 12%iges Polyacrylamidgel getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das ³⁸⁸Arg-Allel ist durch zwei Fragmente von 80 und 29 bp Grösse

charakterisiert, während das ³⁸⁸Gly-Allel durch ein einziges 109 bp großes Fragment angezeigt wird. Jeder genotypische Analyse wurde dreimal wiederholt.

DNA-Sequenzierung von PCR-Produkten. Zur Sequenzanalyse der Transmembrandomäne des FGFR-4 wurden die PCR-Produkte in den Bluescript-Vektor kloniert. Dazu wurde eine PCR-Reaktion wie bereits beschrieben durchgeführt. Folgende Primer wurden verwendet: sense-GGGAATTCGACCGCAGCAGCGCCCGAGG; α -sense-GCTCTAGAAGAGGGAAGAGGGAGAG. Die PCR-Produkte der Klonierung von FGFR-4^{Arg388}/wt konnten direkt im Vektor pcDNA3 sequenziert werden. Die DNA-Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Nach dem Annealing des T/-Primer an die Plasmid-DNA erfolgte die Sequenzreaktion mit T/-DNA-Polymerase (Pharmacia, Freiburg). Die Produkte der Sequenzreaktion wurden dann auf einem denaturierenden 5 %igen Polyacrylamidgel (7,5 M Harnstoff; 1 x TBE) getrennt und nach dem Trocknen auf Röntgenfilmen exponiert (siehe Fig.3). Hieraus ergaben sich die DNA-Sequenz des Wildtyps als auch der Mutation.

Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse. $2,2 \cdot 10^6$ Zellen wurden auf 10 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht inkubiert. Dann wurde das Zellmedium durch Medium ohne fötales Rinderserum ersetzt und weitere 24 h inkubiert. Zur Stimulation wurden die Zellen 10 min mit 50 ng aFGF/ml inkubiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 300 μ l kaltem Lysispuffer (1 % w/w NP-40; 1,25 % w/v Natriumdeoxycholat; 0,1 % w/v SDS, 0,15 M NaCl; 0,01 M Natriumphosphat, pH 7,2; 2 mM EDTA; 10 mM Natriumfluorid; 1 mM PMSF; 20 μ g/ml Aprotinin; 1 mM Orthovanadat; 10 mM Natriumpyrophosphat) bei 4°C 15 min inkubiert und das Lysat durch Zentrifugation (13000 upm) bei 4°C geklärt. Zur Proteinwertbestimmung wurde der Mikro-BCA-Protein-Assay (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Immunpräzipitation wurden die Zelllysate auf eine gleiche Proteinmenge eingestellt und dann mit 0,5 μ g Anti-FGFR-4 (Santa Cruz) und Protein-A-Sepharose (Pharmacia Freiburg) 18 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Immunkomplexe wurden 4 mal mit kaltem HNTG (20 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Triton X100; 10 % Glycerin; 10 mM Natriumpyrophosphat) gewaschen. Zur Probenvorbereitung wurden die Immunkomplexe mit 50 μ l 3 x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 99°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem 7,5 %igen SDS-PAGE getrennt (siehe Figur 1).

Für Western-Blots wurden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation für 2 h mit TBS-T/0,25 % Gelatine (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween20) bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte 6 h bei 4°C auf einem Kippschüttler. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden dann durch 4 mal Waschen mit TBS-T/0,25 % Gelatine entfernt. Die Bindung sekundärer Antikörper erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Durch einen weiteren Waschschrift wurden die unspezifisch gebundenen sekundären Antikörper entfernt. Immunkomplexe wurden durch den ECL™-Kit (Amersham, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht.

Statistische Methoden. Statistische Berechnungen wurden mit Hilfe der Statistikprogramme MedCalc (MedCalc Software, Belgien) und EpiInfo 6.04b (CDC, Atlanta, Georgia) durchgeführt. Um die Correlationen zwischen den Genotypen in den verschiedenen Patientengruppen und den klinischen Daten zu bestimmen, wurden eine Odds-Ratio, das Konfidenzintervall (CI) und eine statistische Signifikanz (*P*-value) berechnet. Wegen der geringen Anzahl von ³⁸⁸Arg-homozygoten Patienten wurde diese Gruppe für die statistischen Berechnungen mit der Gruppe der ³⁸⁸Arg-heterozygoten Patienten vereinigt.

Nachweis von FGFR-4 in Tumorzelllinien. Tabelle 1 zeigt die Korrelation zwischen der Expression von RTK und Brustkrebs. Es tritt eindeutig gehäuft eine Expression von RTK bei Zelllinien aus Brustkrebs auf, während keinerlei Expression bei Zelllinien normaler Brustepithelialzellen nachweisbar ist.

TABELLE 1

Nachweis von FGFR-4 in Brustkrebs-Zelllinien

Brustkrebs-Zelllinien	Northern Blot
	FGFR-4
1 HTB-30 (SK-BR-3)	++
2 HTB-122 (BT-549)	-
3 MCF-7	+
4 BT-483	+++
5 T-47D	+

6 ZR-75-1	+++
7 MDA-MB-468	-
8 MDA-MB-453	++++
9 MDA-MB-361	++++
10 MDA-MB-415	-
11 MDA-MB-231	-
<u>Normale Brustepithelial-Zelllinien</u>	
12 HBL-100	-
13 MCF-10A	-

Legende:

- : keine Expression
 +: Expression
 ++: starke Expression
 +++: sehr starke Expression
 ++++: extreme Expression

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß die G388R-Mutation auch bei Zelllinien anderer Krebsarten auftritt und mit diesen korrelierbar ist. Bei gesunden Epithelial-Zelllinien ist die Mutation nicht nachweisbar.

TABELLE 2**Mutation FGFR-4 G388R in verschiedenen anderen Tumorzelllinien**

<u>Probe</u>	<u>genomische DNA</u>	<u>cDNA</u>
<u>Glioblastom</u>		
U-138	-/-	-/-
U-373	-/-	-/-
U-172	-/-	-/-
U-118	-/*	-/*
SF-763	-/-	-/-
U-1240	*/*	*/*
T-98G	(*)/-	(*)/-
U-937	-/-	-/-

Neuroblastom

SK-N-SH	-/*	-/*
SH-SY-SY	-/*	-/*

Gebärmutterkrebs

OAW-42	-/*	-/*
PA-1	-/-	-/-
Caov-3	-/-	-/-

Squamous

Hlac-78	-/-	-/-
Hlac-79	-/-	-/-
Scc-4	-/-	-/-
Scc-10a	-/-	-/-
Scc-10b	-/-	-/-
Scc-17a	-/-	-/-
Scc-17b	-/-	-/-
Scc-22a	*/*	*/*
Scc-22b	*/*	*/*
HaCat	-/-	-/-
FaDu	-/-	-/-

normale Brustepithelial-Zelllinien

HBL-100	-/-	-/-
MCF-10A	-/-	-/-

Legende:

-/- homozygot unmutiert

*/- heterozygot mutiert

/ homozygot mutiert

Nachweis der FGFR-4-Mutation G388R in Biopsien. Tabelle 3 zeigt demnach, daß von 61 untersuchten Patientinnen mit Brustkrebs aus St. Petersburg 56 % die G388R-Mutation trugen, davon 45 % heterozygot und 11 % homozygot. Von den 69 untersuchten Brust-

krebspatientinnen aus München trugen 43 % die G388R-Mutation, davon 32 % heterozygot und 11 % homozygot. Der Anteil der Gesamtprozentzahl der Mutation bei Patientinnen aus St. Petersburg bzw. München ist unterschiedlich. Dies legt nahe, daß es sich bei der G388R-Mutation um eine Keimbahnmutation handelt.

TABELLE 3

Nachweis von FGFR-4-Mutation G388R in Biopsien

Proben aus Brusttumoren

aus St. Petersburg		aus München		
Probe	gen. DNA	Probe	gen. DNA	cDNA
19 102 T	*/-	5382 T	*/-	*/-
20 102 N		5609T	*/	*/
21 103 T	*/-	8926 T	*/-	*/-
22 103 N	*/-	9456 T	*/	*/
23 2 T	*/	9556 T	*/-	*/-
24 2 N	*/	10347 T	-/-	-/-
25 12 T	-/-	10555 T	-/-	-/-
26 12 N		10681 T	*/-	*/-
27 13 T	-/-	10781 T	*/-	*/-
28 13 N		10808 T	*/	*/
29 14 T	*/-	11189 T	*/-	*/-
30 14 N	*/-	11526 T	*/-	*/-
31 15 T	-/-	11697 T	*/-	
32 15 N		11820 T	-/-	-/-
33 17 T	*/-	12015 T	-/-	-/-
34 17 N	*/-	12166 T	*/-	*/-
35 18 T	-/-	13932 T	*/-	*/-
36 18 N		16003 T	*/-	*/-
37 20 T	-/-	16353 T	-/-	-/-
38 20 N		1 N		
39 21 T	*/	2 T	*/-	*/-
40 21 N	*/	3 N		
41 22 T	*/-	4 T	-/-	-/-
42 22 N		5 N		
43 23 T	*/-	6 T	-/-	-/-
44 23 N		7 N		
45 31 T	*/-	8 T	-/-	-/-
46 31 N	*/-	9 N		
47 42 T	-/-	10 T	*/-	*/-
48 42 N		11 N		
49 43 T	-/-	12 T	-/-	-/-
50 43 N		13 N		

51 45 T	-/-	14 T	*/-	*/-
52 45 N		16 T	*/-	*/-
53 47 T	*/-	17 N		-/-
54 47 N	*/-	18 T		*/-
55 48 T	-/-	19 N		
56 48 N		20 T		-/-
57 50 T	-/-	38 T		-/-
58 50 N		3433 T		-/-
59 53 T	-/-	3539 T		
60 53 N		3631 T		*/
61 54 T	*/-	3632 T		-/-
62 54 N	*/-	3636 T		-/-
63 55 T	-/-	3637 T		*/-
64 55 N		3638 T		-/-
65 60 T	*/-	3640 T		-/-
66 60 N	*/-	991 N		-/-
67 61 T	*/	991 T		-/-
68 61 N	*/	15153 N		
69 62 T	*/-	15153 T		-/-
70 62 N	*/-	15856 N		*/
71 63 T	*/-	15856 T		*/
72 63 N	*/-	12845 N		
73 67 T	*/-	12845 T		-/-
74 67 N	*/-	19044/93 N		
75 69 T	-/-	19044/93 T		-/-
76 69 N		9426/93 N		
77 78 T	*/-	9426/93 T		-/-
78 78 N	*/-	2005 N		*/
79 79 T	*/	2005 T		*/
80 79 N	*/	14860 N		
81 82 T	-/-	14860 T		-/-
82 82 N		4198 T		-/-
83 83 T	-/-	5739 T		*/
84 83 N		6060/93 tum		*/
85 85 T	-/-	6982/93 tum		-/-
86 85 N		7244/93 tum		-/-
87 86 T	*/-	8114/93 tum		-/-
88 86 N	*/-	8335/93 tum		*/-
89 87 T	-/-	8481/93 tum		*/-
90 87 N		8566/93 tum		-/-
91 89 T	-/-	8786/93 tum		*/
92 89 N		9145/93 tum		-/-
93 94 T	-/-	9354/93 tum		-/-
94 94 N		9796/93 tum		-/-
95 97 T	*/	9798/93 tum		-/-
96 97 N	*/-	10125/93 tum		-/-
97 98 T	-/-	10150/93 tum		*/-
98 98 N		11218/93 tum		-/-
99 99 T	*/	11673/93 tum		-/-
100 99 N	*/	13232/93 tum		-/-
101 100 T	-/-	13316/93 tum		*/-

102 100 N	
103 101 T	*/-
104 101 N	*/-
105 102 T (#20)	*/-
106 102 N (#19)	*/*
107 103 T (#22)	*/-
108 103 N (#21)	
109 104 T	*/-
110 92 T	*/*
111 65 T	
112 52 T	*/-
113 35 T	*/-
114 33 "A" T	*/-
115 33 "B" mts.	*/-
116 30 T	*/-
134 30 N	*/-
117 27 T	*/*
133 27 N	*/*
118 24 T	*/-
119 10 T	*/-
132 10 T	*/-
120 3 T	-/-
121 90 T	-/-
122 90 N	
123 80 T	-/-
124 80 N	
125 81 T	-/-
126 58 T	-/-
127 51 T	*/-
128 51 N	
129 44 T	*/-
130 44 N	

14724/93 tum	-/-
14879/93 tum #1	-/-
14879/93 tum #2	-/-
15645/93 tum	-/-

Korrelation zwischen der FGFR-4-G388R-Mutation und dem Nachweis von FGFR-4-Expression. Aus der folgenden Tabelle 4 geht hervor, daß die G388R-Mutation (genomische DNA und cDNA) nur dann auftritt, wenn eine Expression und/oder verstärkte Expression auftritt. Die Mutation ist weder in den normalen Brustepithelial-Zelllinien noch bei den Brustkrebs-Zelllinien nachweisbar, bei denen keine RTK-Expression gefunden wurde.

Die Zelllinie MDA-MB 453, deren RTK-Expression besonders ausgeprägt ist, zeigt eine homozygote G388R-Mutation.

TABELLE 4

**Korrelation zwischen der FGFR-4-G388R-Mutation und dem
Nachweis von FGFR-4-Expression**

Brustkrebs-Zelllinien	Northern Blot	Mutation	
	FGFR-4	cDNA	gen. DNA
1 HTB-30 (SK-BR-3)	++	+/+	+/+
2 HTB-122 (BT-549)	-	-/-	-/-
3 MCF-7	+	+/-	+/-
4 BT-483	+++	+/-	+/-
5 T-47D	+	+/-	+/-
6 ZR-75-1	+++	+/-	+/-
7 MDA-MB-468	-	-/-	-/-
8 MDA-MB-453	++++	+/+	+/+
9 MDA-MB-361	++++	+/-	+/-
10 MDA-MB-415	-	-/-	-/-
11 MDA-MB-231	-	-/-	-/-
<u>Normale Brustepithelial-Zelllinien</u>			
12 HBL-100	-	-/-	-/-
13 MCF-10A	-	-/-	-/-

Legende:

- : keine Expression
- +: Expression
- ++: starke Expression
- +++ : sehr starke Expression
- ++++: extreme Expression
- /-: keine Mutation
- +/-: heterozygot mutiert
- +/+: homozygot mutiert

Untersuchung der Korrelation zwischen dem Auftreten der FGFR-4-Mutation G388R und dem Status der Lymphknoten-Metastasierung bzw. der rediviv-freien Überlebenszeit.

Die Tabelle 5 zeigt die klinischen Parameter aller Patienten, die an der Untersuchung zur Rolle der G388R-Mutation in der Tumorgenese von Brustkrebs teilgenommen haben. Es zeigt sich, daß Patienten mit einer G388R-Mutation eine schlechtere Langzeitprognose haben, als Patienten ohne G388R-Mutation.

TABELLE 5
FGFR-4-Genotypen und klinische Patientendaten

PathoNr.	Her2	GEN	OPDAT	BEDAT	M/R	REZDAT	Vers	TODDAT	ÜBERRE	Überleb	Alter	stage	Nod.	Grade	Men	E-Rec	P-Rec
489292		G/G	31.03.92	14.02.97	0		0		59	59	71,7	1c	0	2	2	12	9
617792		G/G	24.04.92	14.07.94	0		0		27	27			1				
639792	0	G/G	29.04.92	03.04.94	0		0		23	23			0				
724493		G/G	11.05.93	23.06.97	0		0		48	48	64,3	2	1	2	2	12	12
914593	0	G/G	16.06.93	07.03.96	0		0		33	33	86,2	2		2	2	8	9
935493	2+	G/G	21.06.93	15.03.96	0		0		33	33	49,6	2	1	3	2	0	0
963392		G/G	30.06.92	30.06.97	0		0		60	60	79,4	1b	0	2	2	3	12
979693		G/G	29.06.93	07.03.96	0		0		33	33	46,7	2	0	2	3	9	0
979893	1+	G/G	29.06.93	30.06.97	0		0		48	48	77	4b	1	2	2	1	0
1034792	0	G/G	13/07.92	26.03.97	0		0		56	56	43,5	3	1	2	1	0	6
1323293		G/G	02.03.93	05.08.97	0		0		48	48	61,4	2	1	3	2	0	0
1331693	3+	G/G	30.09.92	29.03.95	0		0		36	36	71,2	2	1	2	2	6	1
1564593	1+	G/G	19.10.92	19.06.97	0		0		56	56	65,3	2	1	2	2	0	0
78692		G/G	19.01.88	29.06.93	0		0		65	65	63,8	2	0	3	2	4	12
176989	3+	G/G	08.02.85	06.02.92	0		0		84	84	43,4	2	1	2	1		
273690	1+	G/G	22.02.86	14.02.92	0		0		72	72	52,3	2	0	2	1	12	12
725289		G/G		14.12.87	0						49,5	2	0		2	0	0
729991	0	G/G	23.05.87	22.02.92	0		0		57	57	65,7	2	1	2	2	12	12
733290	1+	G/G	28.05.86	28.03.87	0		1	28.03.87	14	14	81,7	1b	0	2	2	12	12
826790	2+	G/G	19.06.86	22.01.94	0		0		91	91	77,7	2	0	2	2	9	0
867191	0	G/G	19.06.87	22.01.94	0		0		79	79	77,5	2	0	3	2	0	0
988590		G/G	24.07.86	22.01.94	0		0		90	90	61,5	1b	0	2	2	6	9
991790	0	G/G	23.07.86	25.03.92	0		0		68	68	50,7	1c	0	2	2	8	4
1031190	2+	G/G	30.07.86	26.01.94	0		0		90	90	43,4	1c	0	2	1		
1033391	1+	G/G	21.07.87	03.03.92	0		0		55	55	62,4	2	1	3	2	12	12
1055592		G/G	14.07.88	25.04.93	0		1	25.04.93	57	79	77,8	2	0	2	2	6	12
1101191	0	G/G	31.07.87	03.06.93	0		0		70	70	48,5	2	0	2	1	0	0
1426491	1+	G/G	08.10.87	04.02.94	0		0		76	76	54,9	1b	0	3	2	0	0
1560492		G/G	22.09.88	02.04.92	0		0		42	42	50	1c	0	3	3	0	0
1605790	0	G/G	25.11.86	20.02.92	0		0		63	63	56,4	1c	1	2	2	12	6
1641488	2+	G/G	21.12.84	04.02.94	0		0		109	109	67,4	1b	0	2	2		9

TABELLE 5 (FORTS.)

PathoNr.	Her2	GEN	OPDAT	BEDAT	M/R	REZDAT	Vers	TODDAT	ÜBERRE	Überleb	Alter	stage	Nod.	Grade	Men	E-Rec	P-Rec
1121893	1+	G/G	23.07.93	18.01.96	1	06.09.94	1	18.01.96	14	16	59.9	2	1	3	2	4	2
1201592	1+	G/G	10.08.92	25.04.95	1	25.04.95	0		29	29	48.9	1c	1	2	1	1	6
258093	0	G/G	22.02.85	18.04.91	1	30.11.89	1	18.04.91	57	102	79.4	1c	1	2	2		
479090	3+	G/G	04.04.86	23.07.89	1	12.04.88	1	23.07.89	24	55	67.9	1c	0	2	2	0	0
806490	0	G/G	14.06.86	18.09.90	1	10.11.88	1	18.09.90	29	71	66.7	2	1	2	2	8	0
963589	1+	G/G	26.07.85	06.03.89	1	26.04.88	1	06.03.89	33	60	47.8	2	1	3	1	0	
972291	3+	G/G	09.07.87	19.08.89	1	16.07.88	1	19.08.89	12	35	48.3	2	0	3	1	0	0
995589	0	G/G	01.08.85	27.06.88	1	29.04.87	1	27.06.88	21	48	58.4	3	1	3	2	6	
1112389	3+	G/G	30.08.85	14.07.86	1	14.06.86	1	14.07.86	9	14	79.4	4b	2	2	2	0	0
1726892		G/G	18.11.88	23.04.91	1	07.11.90	1	23.04.91	24	40	38.7	2	0	3	1	0	0
289791	3+	G/R	25.02.87	02.04.92	0		0		61	61	48.1	2	1	3	2	0	0
337293		G/R	03.03.89	04.03.92	0		0		36	36	51.2	1c	0	2	1	6	2
879290	2+	G/R	01.07.86	01.10.92	0		1	01.10.92	75	103	44.9	1c	0	3	1	1	6
893090	0	G/R	03.07.86	17.12.93	0		0		89	89	68.5	4	0	3	2	12	6
1106192		G/R	23.07.88	04.02.94	0		0		66	66	53.9	1c	0	2	2	2	12
1107789		G/R	29.08.85	13.02.92	0		0		77	77	50.3	1c	0	2	1	8	12
1113892		G/R	24.07.92	14.10.97	0		0		63	63	51.9	2	0	1	2	2	6
1118990		G/R	19.08.86	15.02.92	0		0		66	66	53.8	1c	0	2	2	6	4
1152692	3+	G/R	31.07.92	30.06.97	0		0		59	59	57.7	2	1	2	2	4	12
1599789	1+	G/R	14.12.85	15.02.87	0		1	15.02.87	14	19	80.2	1c	0	3	2	3	2
1614591	0	G/R	12.11.87	25.02.92	0		0		51	51	76.7	2	1	2	2	3	9
92390	0	G/R	20.01.86	13.02.92	1	09.02.91	0		61	73	45.8	2	1	3	1	0	1
99289	0	G/R	23.01.85	17.03.92	1	22.02.90	0		61	86	47.1	1c	1	2	1		
130588	2+	G/R	20.01.84	30.01.92	1	18.02.87	0		37	96	39	2	1	2	1		
306490	3+	G/R	01.03.86	06.06.87	1	06.11.86	1	06.06.87	8	21	52.2	2	1	3	3	0	0
492191	3+	G/R	07.04.87	20.04.94	1	10.10.90	0		42	84	56.2	2	1	3	2	3	0
529692		G/R	07.04.92	29.03.96	1	23.02.95	1	29.03.96	34	46	66.9	1b	0	3	2	0	0
529990	3+	G/R	17.04.86	29.04.87	1	14.04.87	1	29.04.87	12	17	77.1	2	1	3	2	0	0
538292	3+	G/R	07.04.92	13.10.93	1	07.04.92	1	13.10.93	0	18	56.1	4	2	3	2	0	0
614091	2+	G/R	29.04.87	21.04.90	1	31.07.88	1	21.04.90	15	49	47.2	2	2	2	1	2	6
651591	0	G/R	07.05.87	17.09.93	1	14.04.90	0		35	76	49.3	3	1	2	1	3	9
673592		G/R	06.05.92	27.02.96	1	06.06.93	0		13	45	36.8	2	0	2	1	0	0
678092	2+	G/R	07.05.92	29.06.96	1	07.05.92	0		0	49	56.7	1c	1	2	2	0	0
714289	2+	G/R	04.06.85	16.09.89	1	30.06.87	1	16.09.89	25	71	55	1c	1	2	2	8	

TABELLE 5 (FORTS.)

PathoNr.	Her2	GEN	OPDAT	BEDAT	M/R	REZDAT	Vers	TODDAT	ÜBERRE	Überleb	Alter	stage	Nod.	Grade	Men	E-Rec	P-Rec
807492	0	G/R	29.05.92	29.11.96	1	29.11.96	0		54	54			1				
848193		G/R	03.06.93	10.09.94	1	16.08.94	1	10.09.94	15	16	58	2	2	2	2	0	4
955692	1+	G/R	29.06.92	26.11.96	1	17.08.95			37	53	49.9	1c	1	3	3	2	1
1022090	0	G/R	29.07.86	02.07.88	1	23.06.88	1	02.07.88	23	32	51.7	2	2	2	2	12	1
1054987		G/R	05.08.83	15.12.84	1	29.02.84	1	15.12.84	7	23	71.5	2	0	3	2		
1078192	2+	G/R	20.07.92	22.10.95	1	25.09.95	0		38	39	79.4	2	1	3	2	1	9
1079689	2+	G/R	22.08.85	27.03.91	1	31.12.89	1	27.03.91	52	93	81.4	4	2	3	2		
1169792	2+	G/R	04.08.92	01.07.95	1	01.07.95	1	01.07.95	47	47	67.3	2	1	3	2	6	9
1216692	0	G/R	12.08.92	30.07.96	1	09.09.94	0		23	48	45.3	2	1	2	1	4	6
1314689	2+	G/R	16.10.85	21.02.92	1	05.11.91	0		73	76	81.2	4	1	2	2	6	12
1391992	2+	G/R	17.09.92	01.05.93	1	15.01.93	1	01.05.93	5	8	76	2	1	3	2		
1696290		G/R	11.12.86	20.02.92	1	30.11.89	0		36	62	55.2	2	0	2	2	6	6
920891		G/R									50.5	2	0	3	1	2	6
213593		R/R	10.02.89	20.04.94	0		0		62	62	45.3	1c	0	2	1	3	6
313791	3+	R/R	28.02.87	21.02.92	0		0		60	60	68.6	2	1	3	2	0	0
878693		R/R	09.06.93	07.09.96	0		0		33	33			0				
1107391	3+	R/R	01.08.87	29.02.92	0		0		55	55	61.5	1c	0	2	2	3	1
1125690		R/R	20.08.86	13.10.93	0		0		86	86	43.1	3	1	3	1	0	0
120788		R/R	27.01.84	24.04.86	1	28.01.86	1	24.04.86	24	37	68.1	2	1	3	2		
560992	3+	R/R	13.04.92	04.04.93	1	10.04.92	1	4.4.93	0	12	59.1	4b	2	3	2	6	0
1008692	2+	R/R	08.07.92	11.07.94	1	17.08.93	1	11.07.94	13	24	47.4	2	1	3	2	0	0
1686490	3+	R/R	10.12.86	23.07.87	1	07.05.87	1	23.07.87	5	10	55.4	2	1	3	2	0	0

Legende:

Her2: Expressionslevel des Her2-Rezeptors;

0 = keine Expression - 3 = Über-Expression

OPDAT: Datum der Operation

M/R: Metastasierung / Rezidiv; 0 = nein / 1 = ja

Vers: Verstorben; 0 = nein / 1 = ja

ÜBERRE: Überlebenszeit ohne Rezidiv in Monaten

Grade: Differenzierungsgrad des Tumors;

1 = starke Differenzierung / 3 = geringe Differenzierung

stage: Größe des Primärtumors

E-Rec: Expression des Östrogenrezeptors;

0 = keine Expression - 12 = höchste Expression

GEN: Genotyp des FGFR-4;

G = Wildtyp allel; R = mutiertes Allel

BEDAT: Datum der letzten Beobachtung

REZDAT: Datum der Rezidiv Diagnose

TODDAT: Todesdatum

ÜBERLEB: Überlebenszeit allg.

Nod.: Metastasen in den Lymphknoten;

0 = nein / 1 = ja

Men: Menopause

P-Rec: Expression des Progesteronrezeptors;

0 = keine Expression - 12 = höchste Expression

Aus Fig. 4 geht hervor, daß die G388R-Mutation in Patienten, die zur Zeit der ersten Behandlung bereits Metastasen in den Lymphknoten aufwiesen, in einer größeren Anzahl zu finden ist. Von den Patienten mit einer G388R-Mutation hatten 62.7 % Lymphknoten-Metastasen, während von den Patienten ohne G388R-Mutation nur 38.2 % Metastasen in den Lymphknoten zeigten. Da der Status der Lymphknoten-Metastasen ein wichtiger prognostischer Marker zur weiteren Unterscheidung von Tumoren mit einer schlechteren und solche mit einer besseren Prognose darstellt, kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, daß die G388R-Mutation in den untersuchten 85 Patienten zu einer stärkeren Tumورprogression führt.

Aus Fig. 5 ist ersichtlich, daß in der Gruppe der untersuchten Patienten die Rezidiv-freie Überlebenswahrscheinlichkeit sehr viel geringer für diejenigen mit einer G388R-Mutation ist, als für solche Patienten die keine G388R-Mutation aufweisen. Während von den Patienten mit einem Rezidiv 74.4 % den 388R-Genotyp besitzen, haben nur 25.6 % den 388G-Genotyp. Dies zeigt, daß Patienten mit der G388R-Mutation schneller ein Rezidiv bekommen, also nicht erfolgreich therapiert werden konnten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die FGFR-4-Mutation G388R zu einem 2,7fach ($OR=2,7$; $CI: 1,02 < OR < 7,4$) erhöhten Risiko von Metastasenbildung in den Lymphknoten und zu einem 5,44fach ($OR=5,44$; $CI: 1,93 < OR < 7,4$) erhöhten Risiko eines Tumorrezidives führt. Patienten mit einem mutierten FGFR-4-Allel (G388R) scheinen also eine Prädisposition zu einem Tumorreizidiv und damit eine schlechtere Krankheitsprognose zu haben.

Materialien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
N,N'-bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Cäsiumchlorid	BRL, Eggenstein
Desoxynukleotide	Pharmacia, Freiburg

Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Guanidinium Isothiocyanat	Fluka, Schweiz
HEPES	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris	Riedel de Haen, Seelze
Triton X100	Serva, Heidelberg
Tween20	Sigma, Taufkirchen

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen stammten von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Riedel Deutsche Patentamt Haen (Seelze) oder Merck (Darmstadt) und wurden in den höchsten möglichen Reinheitsgraden eingesetzt.

Geräte

Elektrophorese von DNA	Werkstatt, MPI für Biochemie, Martinsried
Elektrophorese von Proteinen	Atto, Japan
Kühlzentrifuge Biofuge 17S	Heraeus, Hanau
Proteintransfer	Semidry Blot-Apparatur, Werkstatt, MPI für Biochemie, Martinsried
Sterilwerkbank	BioGard, The Baker Company, USA
Zellkultur	Brutschrank B5060 EK/CO ₂ , Heraeus, Hanau
Zellzahlbestimmung	Coulter Counter, Coulter Electronics, Glasgow

Literaturverzeichnis

Basilico C. und Moscatelli D.; The FGF family of growth factors and oncogenes, *Advanc. Cancer Res.* 59, 115-164 (1992)

Coulier F., De Lapeyriere O. und Birnbaum D.; Complexité de la famille FGF: la preuve par 9. *Méd./Sci.* 9, 1113-1115 (1993)

Folkman J. und Klagsbrun M.; *Science* 235, 442-447 (1987)

Gival D. und Yayon A.; Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity, *FASEB J.* 6: 3362-3369 (1992)

Johnson D.E. und Williams L.T.; Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family, *Adv. Cancer Res.* 60: 1-41 (1993)

Kimelman D., Abraham J.A., Haaparanta T., Palisi T.M. und Kirschner M.W.; *Science* 242, 1053-1058 (1988)

Mohammadi M. et al., *Science* 276, 955-959 (1997)

Slack J.M.W., Darlington G.G., Heath J.K. und Godsave S.F.; *Nature* 326, 197-200 (1987)

Thomas K.A., Rios-Candelore M., Gimenez-Gallego G., DiSalvo J., Bennett C., Rodkey, J. und Fitzpatrick S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6409-6413 (1985)

Thompson J.A., Haudenschild C.C., Anderson K.D., DiPietro J.M., Anderson W.F. und Maciag T. (1989); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7928-7932 (1989)

<u>Zelllinie</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Nr.</u>
U-138	ATTC	HTB-16
U-373	ATTC	HTB-17
U-172		
U-118	ATTC	HTB-15
SF-763	SUGEN	
U-1240	SUGEN	
T-98G	SUGEN	
U-937	ATCC	CRL-1593
SK-N-SH	ATCC	
SH-SY5Y	F.J.Klinz	HTB-11
OA-W-42	DKFZ	
PA-1	ATCC	CRL-1572
Caov-3	ATCC	HTB-75
Hlac-78	Dr. Wustrow	
Hlac-79	Dr. Wustrow	
Scc-4	ATCC	CRL-1624
Scc10a	Dr. Wustrow	
Scc10b	Dr. Wustrow	
Scc22a	Dr. Wustrow	
Scc22b	Dr. Wustrow	
Scc17a	Dr. Wustrow	
Scc17b	Dr. Wustrow	
FaDu	Dr. Wustrow	
HaCat	Dr. Wustrow	
HBL100	ATCC	HTB-124
MCF10A	ATCC	CRL-10317
SKBr-3	ATCC	HTB-30
BT-549	ATCC	HTB-122
MCF-7	ATCC	HTB-22
BT483	ATCC	HTB-121
T-47-D	ATCC	HTB-133
ZR-75-1	ATCC	CRL-1500
MDA-MB-468	ATCC	HTB-132
MDA-MB-453	ATCC	HTB-131
MDA-MB-361	ATCC	HTB-27
MDA-MB-415	ATCC	HTB-128
MDA-MB-231	ATCC	HTB-26
K-562	ATCC	CCL-243

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem Inhibitor einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) für die Behandlung und/oder Prophylaxe von RTK-Überfunktions-bedingten Beeinträchtigungen, insbesondere von Krebs.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor ein Kinase-inaktiver Rezeptor ist.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Überexpression und/oder veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase erniedrigt und/oder inhibiert wird.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Überexpression und/oder veränderte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase durch eine Mutation des FGFR-4 ausgelöst wird.
5. Verwendung gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei der Mutation um eine oder mehrere Punktmutationen handelt.
6. Verwendung gemäß Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation(en) in der Transmembrandomäne von FGFR-4 auftritt.
7. Verwendung gemäß Anspruch 5 oder Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation(en) zu einem Austausch einer hydrophoben gegen eine hydrophile Aminosäure führt.
8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Punktmutation an AS-Position 388 im FGFR-4-Molekül auftritt.
9. Verwendung gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Punktmutation an AS-Position 388 zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin führt (G388R).

10. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation(en) Keimbahnmutationen sind.
11. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche für die Behandlung von Krebs und/oder auf Hyperproliferation und/oder Invasion zurückzuführende Erkrankungen, insbesondere von Carcinomen, insbesondere durch Inhibition der Metastasenbildung.
12. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche für die Behandlung von Brustkrebs.
13. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Squamous-Zell-Carcinomen.
14. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Glioblastomen.
15. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Neuroblastomen.
16. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 für die Behandlung von Gebärmutterkrebs.
17. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor einen FGFR-4, vorzugsweise einen mutierten FGFR-4, hemmt.
18. Mutierter FGFR-4, der zu einer Überexpression und/oder veränderten Aktivität des Rezeptors in Zellen führt.
19. Mutierter FGFR-4 nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine hydrophobe Aminosäure im Wildtyp-Rezeptor gegen eine hydrophile Aminosäure im mutierten Rezeptor ausgetauscht wurde.

20. Mutierter FGFR-4 nach Anspruch 18 oder 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mutation eine Punktmutation ist und vorzugsweise in der Transmembrandomäne auftritt.
21. Mutierter FGFR-4 nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Punktmutation an Position 388 auftritt, und vorzugsweise ein Glycin durch Arginin ersetzt wird.
22. DNA-Molekül, umfassend eine Sequenz, die für einen mutierten FGFR-4 nach einem der Ansprüche 18 bis 21 kodiert.
23. RNA-Molekül, umfassend eine RNA-Sequenz, die für einen FGFR-4 nach einem der Ansprüche 18 bis 21 kodiert.
24. Verwendung der Sequenzen gemäß einem der Ansprüche 22 und 23 in einer Diagnose von Krankheiten, insbesondere von Krebs.
25. Verwendung nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Sequenz spezifisch die Punktmutation an Position 388 des FGFR-4 detektieren kann.
26. Diagnoseverfahren, insbesondere zur Differentialdiagnose von Krebs, umfassend den Schritt des Nachweisens eines mutierten FGFR-4-Proteins oder eine Nukleinsäure, kodierend hierfür, in einer Patientenprobe.
27. Diagnoseverfahren nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß Nukleinsäure des Patienten mit einer DNA und/oder RNA in Kontakt gebracht wird, so daß ein Signal erhalten wird, das die Anwesenheit und/oder Abwesenheit von mutiertem FGFR-4 anzeigt, und/oder Nukleinsäure des Patienten mit PCR amplifiziert und anschließend mit einem Restriktionsenzym gespalten wird, dessen Erkennungssequenz von der Mutation betroffen ist und/oder Protein des Patienten wird mit einem Antikörper in Kontakt gebracht, der spezifisch ist für das mutierte Protein.
28. Verfahren zum Screenen auf das Vorliegen einer genetischen Prädisposition für das Auftreten von Krebs und/oder anderen Erkrankungen umfassend den Schritt des

Nachweisens eines mutierten FGFR-4-Proteins oder einer Nukleinsäure, kodierend hierfür, oder einer amplifizierten FGFR-4-Nukleinsäure, in einer Patientenprobe.

29. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend den Inhibitor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17.
30. Screeningverfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der Tyrosinkinaseaktivität, wobei der Rezeptor nach einem der Ansprüche 18 bis 21 mit potentiellen Inhibitoren in Kontakt gebracht wird und die Tyrosinkinaseaktivität in Abwesenheit und/oder Anwesenheit des Inhibitors ermittelt wird.
31. Mutierter FGFR-4, vorzugsweise nach einem der Ansprüche 18 bis 21, als Target in der Krebstherapie
32. Antikörper, der mit einem mutierten FGFR-4-Protein nach einem der Ansprüche 18 bis 21 spezifisch reagiert.

1/4

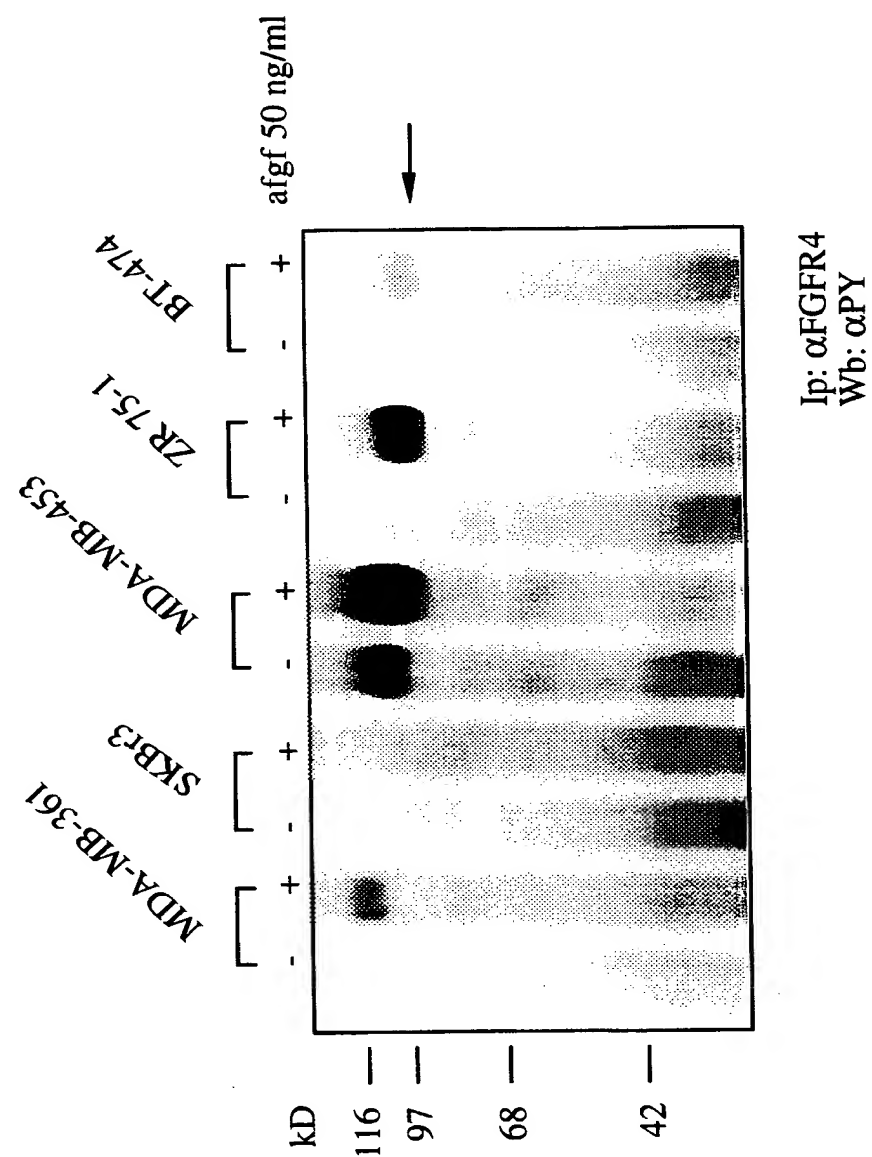


FIG. 1



2/4

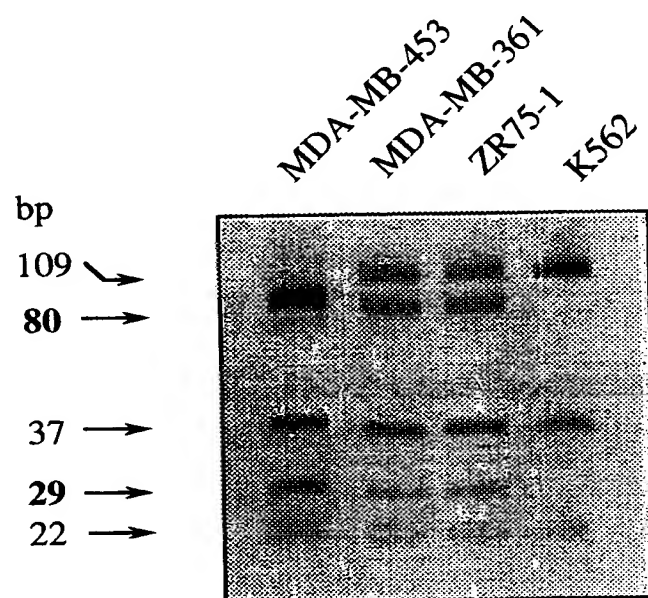


FIG. 2

3/4

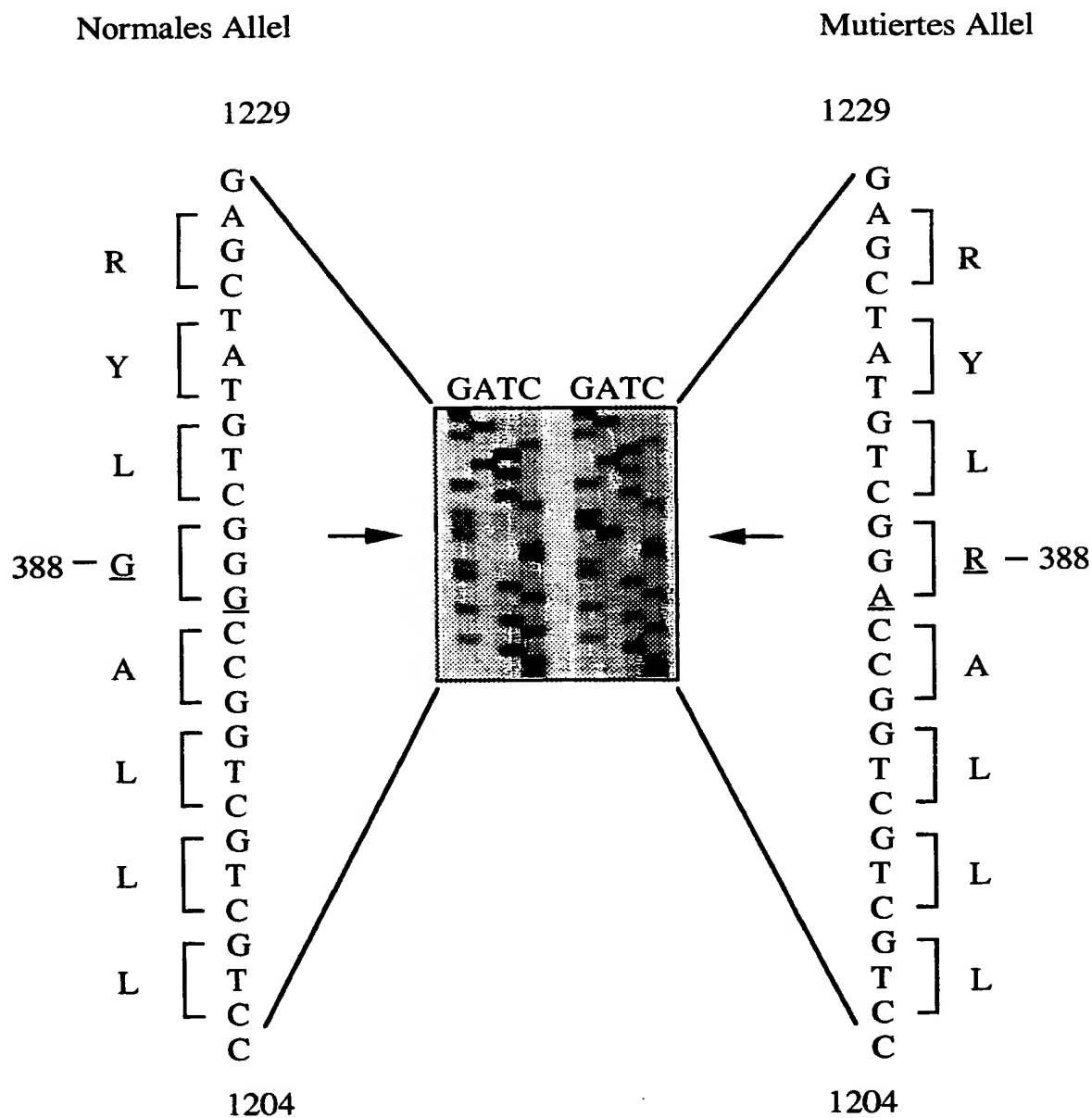


FIG. 3

Fig. 4

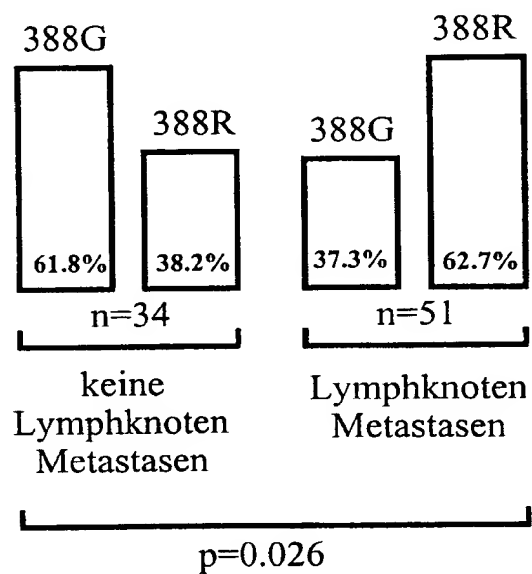
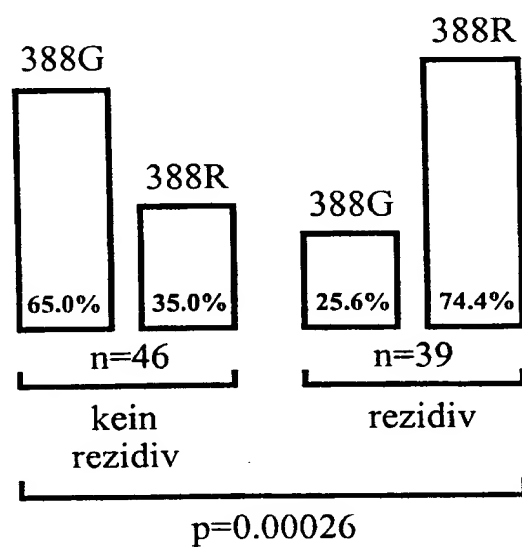


Fig. 5



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.,
Berlin

<120> Verwendung von Inhibitoren für die Behandlung von RTK-
Überfunktions-bedingten Störungen, insbesondere von Krebs

<130> P29374-03166

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 1

Arg	Tyr	Thr	Asp	Ile	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	

Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Tyr
			20					25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 2

Arg	Tyr	Thr	Asp	Ile	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	

Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Tyr
			20					25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. tional Application No

PCT/EP 99/00405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/40 C07K14/71 C07K16/28 C12N15/12 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 13771 A (GLAXO GROUP LIMITED) 17 April 1997 see page 44 - page 52 ---	1-3, 29
A	MOHAMMADI M ET AL: "STRUCTURES OF THE TYROSINE KINASE DOMAIN OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR IN COMPLEX WITH INHIBITORS" SCIENCE, vol. 276, no. 5314, 9 May 1997, pages 955-960, XP002065235 cited in the application ---	1-32
P, X	WO 98 24432 A (SUGEN INC.) 11 June 1998 see page 102 - page 105 ---	1-3, 29, 30
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 1999

Date of mailing of the international search report

06/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00405

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ²	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 98 50356 A (SUGEN, INC.) 12 November 1998 see page 237 - page 264 -----	1-3, 29, 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/00405

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 1-17 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00405

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713771 A	17-04-1997	AU 7289696 A EP 0861253 A HR 960465 A	30-04-1997 02-09-1998 28-02-1998
WO 9824432 A	11-06-1998	AU 7622698 A	29-06-1998
WO 9850356 A	12-11-1998	AU 7684298 A AU 7661498 A	27-11-1998 27-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00405

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K31/40 C07K14/71 C07K16/28 C12N15/12 C1201/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K C07K C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 13771 A (GLAXO GROUP LIMITED) 17. April 1997 siehe Seite 44 - Seite 52	1-3, 29
A	MOHAMMADI M ET AL: "STRUCTURES OF THE TYROSINE KINASE DOMAIN OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR IN COMPLEX WITH INHIBITORS" SCIENCE, Bd. 276, Nr. 5314, 9. Mai 1997, Seiten 955-960, XP002065235 in der Anmeldung erwähnt	1-32
P, X	WO 98 24432 A (SUGEN INC.) 11. Juni 1998 siehe Seite 102 - Seite 105	1-3, 29, 30



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00405

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>W0 98 50356 A (SUGEN, INC.) 12. November 1998 siehe Seite 237 - Seite 264 -----</p>	<p>1-3, 29, 30</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/ 00405

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00405

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9713771	A	17-04-1997	AU	7289696 A	30-04-1997
			EP	0861253 A	02-09-1998
			HR	960465 A	28-02-1998
WO 9824432	A	11-06-1998	AU	7622698 A	29-06-1998
WO 9850356	A	12-11-1998	AU	7684298 A	27-11-1998
			AU	7661498 A	27-11-1998

Patent Claims

1. Use of at least one inhibitor of a receptor tyrosine kinase (RTK) for the treatment and/or prophylaxis of RTK-hyperfunction-induced disorders, particularly cancer.
2. Use according to Claim 1, **characterised in that** the inhibitor is a kinase-inactive receptor.
3. Use according to Claim 1 or Claim 2, **characterised in that** an overexpression and/or altered activity of the receptor tyrosine kinase is lowered and/or inhibited.
4. Use according to Claim 3, **characterised in that** the overexpression and/or altered activity of the receptor tyrosine kinase is triggered by a mutation of FGFR-4.
5. Use according to Claim 4, **characterised in that** the mutation is one or several point mutations.
6. Use according to Claim 5, **characterised in that** the mutation(s) occurs in the transmembrane domain of FGFR-4.
7. Use according to Claim 5 or Claim 6, **characterised in that** the mutation(s) leads to an exchange of a hydrophobic for a hydrophilic amino acid.
8. Use according to one of Claims 5 to 7, **characterised in that** the point mutation occurs at AA position 388 in the FGFR-4 molecule.
9. Use according to one or several of the foregoing Claims 5 to 8, **characterised in that** the point mutation at AA position 388 leads to an exchange of glycine for arginine (G388R).
10. Use according to one or several of the foregoing Claims, **characterised in that** the mutation(s) are germ line mutations.



11. Use according to one or several of the foregoing Claims for the treatment of cancer and/or disease attributable to hyperproliferation and/or invasion, particularly carcinomas, in particular by inhibition of metastasis formation.
12. Use according to one or several of the foregoing Claims for the treatment of breast cancer.
13. Use according to one or several of Claims 1 to 11 for the treatment of squamous cell carcinomas
14. Use according to one or several of Claims 1 to 11 for the treatment of glioblastomas.
15. Use according to one or several of Claims 1 to 11 for the treatment of neuroblastomas.
16. Use according to one or several of Claims 1 to 11 for the treatment of uterine cancer.
17. Use according to one of the foregoing Claims 1 to 16, **characterised in that** the inhibitor inhibits an FGFR-4, preferably a mutated FGFR-4.
18. Mutated FGFR-4, which leads to overexpression and/or altered activity of the receptor in cells.
19. Mutated FGFR-4 according to Claim 18, **characterised in that** a hydrophobic amino acid in the wild type receptor has been exchanged for a hydrophilic amino acid in the mutated receptor.
20. Mutated FGFR-4 according to Claim 18 or 19, **characterised in that** the mutation is a point mutation and preferably occurs in the transmembrane domain.
21. Mutated FGFR-4 according to Claim 18, **characterised in that** the point mutation occurs at position 388, and preferably a glycine is replaced by arginine.

22. DNA molecule, containing a sequence which codes for a mutated FGFR-4 according to one of Claims 18 to 21.
23. RNA molecule, containing a sequence which codes for a mutated FGFR-4 according to one of Claims 18 to 21.
24. Use of the sequences according to one of Claims 22 and 23 in a diagnosis of diseases, particularly of cancer.
25. Use according to Claim 24, **characterised in that** the sequence can specifically detect the point mutation at position 388 of FGFR-4.
26. Diagnostic procedure, in particular for the differential diagnosis of cancer, including the step of the detection of a mutated FGFR-4 protein or a nucleic acid coding therefor, in a case sample.
27. Diagnostic procedure according to Claim 26, **characterised in that** nucleic acid of the patient is brought into contact with a DNA and/or RNA, so that a signal is obtained which indicates the presence and/or absence of mutated FGFR-4, and/or nucleic acid of the patient is amplified by PCR and subsequently cleaved with a restriction enzyme whose recognition sequence is affected by the mutation and/or protein of the patient is brought into contact with an antibody which is specific for the mutated protein.
28. Procedure for screening for the presence of a genetic predisposition for the occurrence of cancer and/or other diseases including the step of the detection of a mutated FGFR-4 protein or a nucleic acid coding therefor, or an amplified FGFR-4 nucleic acid, in a case sample.
29. Pharmaceutical composition including the inhibitor according to one or several of Claims 1 to 17.



30. Screening procedure for the identification of inhibitors of tyrosine kinase activity, wherein the receptor according to one of Claims 18 to 21 is brought into contact with potential inhibitors and the tyrosine kinase activity is determined in the presence and/or absence of the inhibitor.
31. Mutated FGFR-4, preferably according to one of Claims 18 to 21, as target in cancer therapy.
32. Antibody which reacts specifically with a mutated FGFR-4 protein according to one of Claims 18 to 21.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT 978-03166/sm	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/00405	International filing date (<i>day/month/year</i>) 22 January 1999 (22.01.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 22 January 1998 (22.01.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/40, C07K 14/71, 16/28, C12N 15/12, C12Q 1/68		
Applicant MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 August 1999 (20.08.99)	Date of completion of this report 09 May 2000 (09.05.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/00405

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-32, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-32, filed with the letter of 02 September 1999 (02.09.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/00405

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-28, 30-32	YES
	Claims	29	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-28, 30-32	YES
	Claims	29	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	18-23, 29, 31, 32	YES
	Claims	1-17, 24-28, 30 (see Box V)	NO

2. Citations and explanations

1. The examination has been carried out on the assumption that the priority claim is valid.

2. If Claim 29 is interpreted in the light of paragraph 3 on page 10 of the description, the inhibitors are known from (for example) the search report citation MOHAMMADI et al., Science, Vol. 276, pages 955-960 (1997).

However, this same document also discloses pharmaceutical compositions containing these inhibitors.

The subject matter of Claim 29 is therefore not novel.

3. The closest prior art for the remaining claims is WO-A-97/13771.

The compounds described in WO-A-97/13771 are inhibitors of the receptor tyrosine kinases c-erbB-2, EGF-R and PDGF-R, and are used against cancer and other conditions (see page 7, paragraphs 4 and 7, and the claims).

The subject matter of Claim 1 of the present application differs from the above in that the receptor tyrosine kinase is FGFR-4.

Since it is not obvious to a person skilled in the art that

inhibition of the receptor tyrosine kinase FGFR-4 is also appropriate in the treatment of cancer and other conditions, the subject matter of Claim 1 and dependent Claims 2-17 involves an inventive step.

4. The subject matter of Claims 18-28 and 30-32 is less closely related to that of WO-A-97/13771 and also involves an inventive step.
5. The PCT contracting states do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 1-17, 24-28 and 30. Patentability may depend on, among other things, the wording of the claims. For example, the European Patent Office does not recognise the industrial applicability of claims relating to the use of a compound for medical or diagnostic purposes. It may, however, allow claims relating to the first medical or diagnostic use of a known compound, or to the use of such a compound in the preparation of a drug or diagnostic agent for a new medical or diagnostic application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/00405

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 98 24432	11 June 1998 (11.06.1998)	02 December 1997 (02.12.1997)	05 December 1996 (05.12.1996)
WO 98 50356	12 November 1998 (12.11.1998)	07 May 1998 (07.05.1998)	07 May 1997 (07.05.1997)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Apart from the general reference to the article by Mohammadi et al. (page 10, paragraph 3), no specific examples of FGFR-4 inhibitors are given.

In order to meet the requirement of PCT Article 5, the inhibitors disclosed in the said document should be specified in the description (see PCT Guidelines, Chapter II, 4.17).

2. Claim 29 is not clear because it refers to inhibitors according to Claims 1-17, which are usage claims rather than product claims.

The same is true of Claim 10 insofar as it refers back to Claims 1-3, since Claims 1-3 do not include the term "mutation".

